

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude transcriptomique de l'apoptose induite chez les cellules cancéreuses effet de l'hypoxie

SERMEUS, Audrey

Award date:
2005

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ÉTUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE L'APOTOSE INDUITE CHEZ LES CELLULES
CANCEREUSES : EFFET DE L'HYPOXIE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Audrey SERMEUS
Juin 2005



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ÉTUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE L'APOPTOSE INDUITE CHEZ LES CELLULES
CANCEREUSES : EFFET DE L'HYPOXIE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Audrey SERMEUS
27 juin 2005

Étude transcriptomique de l'apoptose induite chez les cellules cancéreuses : effet de l'hypoxie

SERMEUS Audrey

Résumé

Lorsqu'une tumeur atteint une taille supérieure à 1 mm³, son centre devient hypoxique, c'est-à-dire que les cellules qui s'y trouvent ne reçoivent plus assez d'oxygène. Celles-ci vont donc élaborer une réponse pour s'adapter à ce stress. En plus de permettre aux cellules de survivre dans ces conditions, cette réponse adaptative engendre une résistance des cellules à différents types de thérapies anti-cancéreuses, dont la chimiothérapie. Ces thérapies ont pour but d'engendrer la mort des cellules tumorales par apoptose. L'hypoxie pourrait donc protéger ces cellules de l'apoptose. Cependant, peu d'éléments sont connus quant aux mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de cet effet.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose induite par l'étoposide – une molécule utilisée cliniquement en chimiothérapie – sur une lignée de cellules cancéreuses, les cellules HepG2. Nous avons tout d'abord vérifié que l'hypoxie protège bien ces cellules de l'apoptose induite par l'étoposide. Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes dont les produits interviennent dans le processus apoptotique. Dans un troisième temps, le niveau d'activation de différents facteurs de transcription a été étudié. Enfin, nous avons tenté d'établir des corrélations entre les profils d'expression des gènes, les profils d'activation des facteurs de transcription et la présence de sites consensus pour ces facteurs de transcription dans le promoteur des gènes étudiés.

Nous pouvons conclure de cette étude que l'étoposide et l'hypoxie engendrent des effets importants et différents sur l'expression des gènes et l'activation des facteurs de transcription. Les facteurs qui semblent jouer un rôle prédominant dans ces changements d'expression génique sont p53, AP-1 et HIF-1. L'influence de l'hypoxie sur leur niveau d'activité en présence d'étoposide pourrait expliquer l'effet anti-apoptotique de l'hypoxie.

Remerciements

A la fin de ce travail, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont aidé, de près ou de loin, à son élaboration.

Je remercie tout d'abord Monsieur le Professeur Remacle d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce mémoire.

Merci à Christelle pour son aide lors de l'utilisation de la TF Chip MAPK, à Maud pour l'Apoptochip, ainsi qu'à Valérie pour les Trans-AM. Je pense également à beaucoup d'autres, pour leurs conseils ponctuels ou leurs réponses à mes questions : Edouard, Martine M, Andrée, Catherine, Sofia, Antoine, Aline, Ludovic, Thierry P., Sébastien V, Laetitia, ...

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe « HIF » - JPP, les deux Seb et Manu - pour leur aide et leurs précieux conseils.

Merci encore à tous les mémorants de l'URBC pour leur présence et leur aide en cas de problème, avec un merci tout particulier à Marianne qui a travaillé avec moi au sein de l'équipe HIF.

Enfin, **et surtout**, je tiens à remercier du fond du cœur ma promotrice, Carine Michiels, pour son encadrement, sa grande patience, ses encouragements, ses conseils, ses réponses précises à toutes mes questions, sa disponibilité ainsi que ses corrections rapides. Ces quelques mois passés à travailler dans son équipe m'ont appris énormément, et ce dans une ambiance très agréable. Un tout grand merci !!!

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adenosine diphosphate
AIF	Apoptosis inducing factor
ALDOA	Aldolase
ALPS	Auto-immune lymphoproliferative syndrome
AMP	Adenosine monophosphate
ANT	Adenine nucleotide translocator
AP-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
ARC	Apoptosis repressor with caspase recruitment domain
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia teleangiectasia Rad3 related
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology
BIR	Baculovirus IAP repeats
BSA	Bovine Serum Albumin
CAD	Caspase-activated deoxyribonuclease
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CDK	Cycline-dependent kinase
CMV	Cytomégalovirus
CO ₂	Dioxyde de carbone
CREB	cAMP responsive element binding protein
Ct	Cycle seuil
DD	Death domain
DED	Death effector domain
Diablo	Direct IAP-binding protein with low pI
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco modified Eagle's Medium
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
dNTP	Déoxy nucleotide tri-phosphate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	Érythropoïétine
FADD	Fas-associated death domain
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide
GPX	Gluthatione peroxydase
H	Hypoxie
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
He	Hypoxie étoposide
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HKG	House keeping gene
HRE	Hypoxia responsive element
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSP	Heat-shock protein
IAP	Inhibitor of apoptosis protein

IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	IGF binding protein
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
N	Normoxie
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
Ne	Normoxie étoposide
NF-κB	Nuclear factor- κB
NO	Oxyde nitrique
PARP	PolyADP-ribose polymerase
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-kinase
PTP(C)	Permeability transition pore (complex)
PVDF	Polyvinylidène fluoride
pVHL	Protéine de Von Hippel Lindau
R110	Rhodamine 110
RNase	Ribonucléase
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcription
SAPK	Stress-activated protein kinase
SDS	Sodium dodécyl sulfate
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SOD	Superoxyde dismutase
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF receptor
TNFRSF	TNFR superfamily
TRADD	TNF-R-associated death domain
TRAF	TNF-R-associated factors
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau
VP-16	Étoposide

Table des matières

I. INTRODUCTION.....	1
AVANT-PROPOS	1
I.1 APOPTOSE	2
I.1.1 Introduction.....	2
I.1.2 Mécanisme.....	3
I.1.2.1 Présentation générale	3
I.1.2.2 Phase de dégradation : les caspases et leurs substrats.....	3
I.1.2.3 Phase de décision	5
I.1.2.3.1 Libération du cytochrome c et formation de l'apoptosome	5
I.1.2.3.2. Hypothèses concernant la perméabilisation membranaire mitochondriale.....	6
I.1.2.4 Phase d'initiation.....	7
I.1.2.4.1 Les récepteurs de mort de la famille du TNFR.....	7
I.1.2.4.2 Privation de facteurs de croissance	8
I.1.2.4.3 Dommages à l'ADN.....	8
I.1.3 Les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.....	9
I.1.4 Apoptose et cancer	11
I.2 HYPOXIE.....	12
I.2.1 Importance et utilisation de l'oxygène.....	12
I.2.2 Réaction générale de l'organisme en hypoxie	12
I.2.3 Perception de la concentration en oxygène par la cellule.....	13
I.2.4 Réponses cellulaires à l'hypoxie.....	14
I.2.5 Le facteur de transcription HIF-1	15
I.2.6 Hypoxie et cancer.....	16
I.3 HYPOXIE ET APOPTOSE	18
I.3.1 Hypoxie comme facteur anti-apoptotique	18
I.3.2 Hypoxie comme inducteur d'apoptose.....	18
I.4 OBJECTIFS	20
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	21
II.1 REPIQUAGE DES CELLULES	21
II.2 INCUBATIONS	21
II.3 EVALUATION DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN.....	21
II.3.1 Principe.....	21
II.3.2 Méthode	22
II.4 MESURE DE L'ACTIVITÉ DES CASPASES	22
II.4.1 Principe.....	22
II.4.2 Méthode	22
II.5 DOSAGE PROTÉIQUE PAR LA MÉTHODE DE BRADFORD	22
II.6 WESTERN BLOT	23
II.6.1 Principe.....	23
II.6.2 Extraction protéique totale	23
II.6.3 Electrophorèse Tris-Glycine.....	23
II.6.4 Transfert sur membrane.....	24
II.6.5 Blocage, incubations avec les anticorps et révélation.....	24
II.7 IMMUNOFLUORESCENCE	25
II.7.1 Principe.....	25

II.7.2 Méthode	25
II.8 EXTRACTION D'ARN TOTAL	26
II.9 DUALCHIP TM HUMAN APOPTOSIS	26
II.10 RT REAL-TIME PCR	27
II.10.1 Rétrotranscription (RT)	27
II.10.2 Real-Time PCR	27
II.10.2.1 Principe	27
II.10.2.2 Méthode	28
II.11 EXTRACTION DE PROTÉINES NUCLÉAIRES	28
II.12 TFCHIPMAPK	28
II.13 TRANS-AM	29
II.14 SYSTÈMES RAPPORTEURS	29
II.14.1 Principe	29
II.14.2 Méthode	30
II.14.2.1 Transfection	30
II.14.2.2 Première méthode de révélation	31
II.14.2.3 Seconde méthode de révélation	31
II.15 RECHERCHE <i>IN SILICO</i> DE SITES DE LIAISON POTENTIELS POUR DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DANS LES PROMOTEURS DES GÈNES D'INTÉRÊT	31
III. RÉSULTATS ET DISCUSSION	32
III.1 CARACTÉRISATION DU MODÈLE : L'HYPOXIE PROTÈGE LES CELLULES DE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ÉTOPOSIDE	32
III.1.1 Etude de l'activation des caspases	33
III.1.1.1 Mesure de l'activité des caspases	33
III.1.1.2 Etude de l'activation de la caspase 3 par immunofluorescence	33
III.1.1.3 Conclusion	33
III.1.2 Etude du clivage de la protéine PARP par Western Blot	33
III.1.3 Evaluation de la fragmentation de l'ADN	34
III.1.4 Conclusion	34
III.2 ETUDE DE L'EXPRESSION DE GÈNES	35
III.2.1 Etude de l'abondance des ARNm	35
III.2.1.1 Au moyen de la « DualChip TM human apoptosis »	35
III.2.1.2 Par Real-Time PCR	36
III.2.2 Etude de l'abondance de protéines par Western Blot	37
III.2.3 Conclusion	38
III.3 ETUDE DE L'ACTIVATION DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION	39
III.3.1 Etude de l'activité de liaison à l'ADN de facteurs de transcription grâce à la TFChipMAPK	39
III.3.2 Etude de l'activité de liaison à l'ADN de facteurs de transcription par Trans-AM40	
III.3.3 Etude de l'abondance et de la localisation de facteurs de transcription par immunofluorescence	41
III.3.4 Etude de l'activité de facteurs de transcription par système rapporteur	42
III.3.5 Conclusion	43
III.4 ANALYSE <i>IN SILICO</i> DU PROMOTEUR DES GÈNES D'INTÉRÊT	46
III.4.1 Description de la méthode d'analyse	46
III.4.2 Analyse des résultats obtenus	46
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	48

I. Introduction

Avant-propos

Le cancer est une maladie très répandue dont la fréquence augmente de plus en plus, notamment à cause du vieillissement des populations. Une tumeur provient de la prolifération d'une cellule ayant subi successivement différentes mutations dans des gènes cellulaires clés, les gènes suppresseurs de tumeurs et les proto-oncogènes, alors appelés oncogènes. Ces mutations permettent à la cellule cancéreuse de proliférer de manière non contrôlée en absence de signaux stimulant la croissance, ainsi que d'outrepasser les signaux inhibiteurs de croissance et les réponses immunitaires de l'hôte. Elles permettent également à la tumeur de se répliquer de manière indéfinie, de maintenir un apport en oxygène et en nutriments et d'envahir les tissus adjacents et distants. Une dernière caractéristique essentielle de ces cellules cancéreuses est leur résistance à l'apoptose. L'apoptose est un processus très important qui conduit à la mort des cellules inutiles ou dangereuses, permettant ainsi le maintien de l'homéostasie du tissu. Des défauts dans le processus apoptotique sont à la base de la tumorigenèse et de la résistance aux médicaments, entraînant ainsi fréquemment un échec des chimiothérapies. (Johnstone et al., 2002 ; Hanahan and Weinberg, 2000)

Pour croître, une tumeur a besoin d'un apport suffisant en oxygène et en nutriments. Cependant, lorsque la taille de la tumeur dépasse 1 mm³, celle-ci contient des régions à faible concentration en oxygène (hypoxie) à cause du déséquilibre entre les apports et la consommation d'oxygène. Les cellules vont répondre à ce manque d'oxygène par différents mécanismes, dont l'activation du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1), qui vont permettre l'adaptation des cellules aux conditions hypoxiques en augmentant la transcription de différents gènes. Cette hypoxie tumorale est un facteur bien connu pour diminuer l'efficacité de la radiothérapie, de la chimiothérapie et de la thérapie photodynamique, ainsi que pour accélérer le caractère malin de la tumeur et la formation de métastases. (Brown, 1999 ; Koukourakis et al., 2001 ; Beasley et al., 2002 ; Weinmann et al., 2004)

De nombreuses études montrent que la résistance à l'apoptose et l'hypoxie tumorale sont deux facteurs intervenant dans la résistance des tumeurs aux différentes thérapies anti-tumorales. Cependant, le lien existant entre ces deux processus est encore mal connu. Il semble que, lorsqu'elle n'est pas trop sévère, l'hypoxie est capable de protéger les cellules contre l'apoptose. (Piret et al., 2002a, 2004 ; Yamauchi et al., 1987 ; Chung et al., 2004) Afin d'essayer d'expliquer ces observations, nous avons étudié l'influence de l'hypoxie sur l'apoptose induite par l'étoposide, un agent anti-tumoral utilisé, notamment, pour le traitement de certains cancers du poumon, des testicules ainsi que des lymphomes (Meresse et al., 2004). Dans cette introduction, nous décrirons les processus apoptotiques, l'influence de l'hypoxie sur l'organisme, ainsi que les quelques éléments connus quant aux interactions existant entre ces deux processus.

I.1 Apoptose

I.1.1 Introduction

Le mot « apoptose » est d'origine grecque et fait référence à la chute des feuilles. Il s'agit d'un processus physiologique essentiel, également appelé mort cellulaire programmée, qui joue un rôle critique dans le développement et l'homéostasie des tissus en permettant l'élimination très contrôlée des cellules superflues, endommagées ou ectopiques. Le processus apoptotique peut être déclenché pour deux raisons principales. La première est que la mort de cellules excédentaires est nécessaire pour un développement correct. L'apoptose est notamment utilisée pour permettre la résorption de la queue du têtard au moment de sa métamorphose en grenouille et pour le détachement de l'endomètre au début des menstruations. La séparation des doigts et des orteils du fœtus exige aussi la perte du tissu qui les relie par mort cellulaire programmée. Pour permettre la formation de connections appropriées entre les neurones (synapses) dans le cerveau, le surplus de cellules doit être éliminé par apoptose. C'est par ce processus que plus de 50 % des neurones meurent pendant les premières étapes du développement du système nerveux. La mort des cellules permet également la sculpture de structures creuses et la formation des organes reproducteurs. La seconde raison est que l'apoptose est nécessaire pour détruire les cellules qui représentent une menace pour l'intégrité de l'organisme, comme, par exemple, les cellules infectées par des virus ou celles dont l'ADN endommagé les rend susceptibles de provoquer un cancer. Dans le corps humain, environ 10 milliards de cellules doivent mourir chaque jour pour équilibrer les 10 milliards de cellules produites par mitose durant la même période. (Gewies, 2003) (http://fbspcu01.leeds.ac.uk/users/bmbatrl/atrl_topic.htm) (<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html>)

Les cellules apoptotiques présentent différentes caractéristiques morphologiques et biochimiques qui permettent de les différencier des cellules normales ou de celles qui meurent par nécrose. La morphologie d'une cellule apoptotique montre des boursofflures de la membrane plasmique, la condensation et la marginalisation de la chromatine, une fragmentation du noyau, la perte d'adhérence, l'arrondissement (pour les cellules adhérentes) et le rétrécissement cellulaire (Fig. I.1A). Finalement, la cellule va se fragmenter en structures compactes, appelées « corps apoptotiques », enfermées dans des membranes qui contiennent du cytosol, la chromatine condensée et des organites. Ces corps apoptotiques vont alors être phagocytés par des macrophages. Ceci permet d'éviter une réponse inflammatoire et de recycler les constituants cellulaires. En ce qui concerne les caractéristiques biochimiques, citons le clivage de l'ADN entre les nucléosomes qui mène à l'obtention d'une échelle oligonucléosomique (DNA ladder) sur gel d'agarose (Fig. I.1B), le passage de la phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique (flip-flop de la phosphatidylsérine) et le clivage de diverses protéines. L'externalisation de la phosphatidylsérine contribue à la reconnaissance des corps apoptotiques par les macrophages. (Zimmermann et al., 2001; Gewies, 2003)

Contrairement aux cellules apoptotiques, les cellules en nécrose ont subi un dommage majeur qui mène à une perte d'intégrité membranaire (Fig. I.2). Dans ce cas, le contenu cellulaire est libéré de manière non contrôlée dans l'environnement, ce qui engendre des dommages aux cellules environnantes et une réponse inflammatoire forte dans le tissu correspondant. Le processus apoptotique entier nécessitant de l'énergie et une machinerie cellulaire pas trop endommagée, lorsque les dommages cellulaires atteignent un niveau trop important, la cellule peut effectuer les premiers événements de l'apoptose et continuer ensuite par de la nécrose. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>; Gewies, 2003)

Le dérèglement du processus apoptotique est impliqué dans beaucoup de pathologies. Si une résistance aberrante à l'apoptose participe au développement de néoplasmes, à la persistance de clones lymphocytaires auto-réactifs, ainsi qu'à des infections persistantes, une mort cellulaire excessive par apoptose ou nécrose contribue notamment au développement de maladies neurodégénératives comme l'amyotrophie spinale et la chorée de Huntington et à des problèmes autoimmunitaires. (Solary et al., 2002 ; Kroemer and Reed, 2000 ; Gewies, 2003)

I.1.2 Mécanisme

I.1.2.1 Présentation générale

Le processus apoptotique se déroule en trois phases principales : la phase d'initiation, la phase de décision et la phase de dégradation. Pendant l'initiation, des cascades de transduction du signal ou des voies de dommages sont activées. Il s'agit d'une phase pré-mitochondriale impliquant des protéines de la famille Bcl-2 et qui requiert ou non la participation de caspases. Vient ensuite une phase mitochondriale pendant laquelle les membranes mitochondriales sont perméabilisées et des protéines, dont le cytochrome c, libérées : il s'agit de la phase de décision. Enfin, l'activation de caspases est observée pendant la phase post-mitochondriale de dégradation. Ces trois phases vont maintenant être détaillées dans un ordre chronologique inverse. Il est également important de souligner que d'autres organites que la mitochondrie et le noyau seraient impliqués dans les voies de signalisation apoptotiques, principalement le réticulum endoplasmique. La procaspase 12 pourrait en effet être activée au niveau de cet organite lors de la perception de certains stress. Le réticulum endoplasmique pourrait également communiquer avec la mitochondrie, notamment via des signaux dépendants du calcium. (Loeffler and Kroemer, 2000; Adams, 2003)

I.1.2.2 Phase de dégradation : les caspases et leurs substrats

La plupart des caractéristiques apoptotiques observées sont dues au clivage de différents substrats par des protéases activées au cours de ce processus, les caspases (cysteine-dépendent aspartate-specific proteases). L'activité catalytique de ces protéases, qui sont très conservées au cours de l'évolution, dépend d'un résidu cystéine situé dans un pentapeptide QACXG du site actif. Les caspases sont parmi les protéases les plus spécifiques et ne clivent qu'après un résidu acide aspartique. La spécificité distincte de substrats de chaque caspase est déterminée par les quatre résidus amino-terminaux du site de clivage. Une douzaine de caspases ont été identifiées chez l'homme jusqu'à présent. (Hengartner, 2000 ; Zimmermann et al., 2001)

Les caspases sont synthétisées sous forme de zymogènes enzymatiquement inactifs appelés procaspases. Ces zymogènes sont composés de 3 domaines : un prodomaine N-terminal, une grande sous-unité (p20) contenant la cystéine du site actif, et une petite sous-unité C-terminale (p10). Les petite et grande sous-unités sont parfois séparées par un peptide linker. Les caspases peuvent être subdivisées en deux grandes catégories. Les caspases initiateuses (caspases 2, 8, 9 et 10) possèdent un long prodomaine contenant un domaine – CARD (caspase activation and recruitment domain) pour les procaspases 2 et 9 ou DED (death effector domain) pour les procaspases 8 et 10 - favorisant leur interaction avec des molécules activatrices. Les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7), quant à elles, possèdent généralement un prodomaine court. L'activation des procaspases en caspases est réalisée via des clivages protéolytiques entre les domaines p20 et p10, et entre le prodomaine et le

domaine p20. L'enzyme mature est un hétérotétramère contenant 2 hétérodimères p20/p10 et 2 sites actifs (Fig. I.3). (Hengartner, 2000 ; Zimmermann et al., 2001 ; Gewies, 2003)

Les caspases étant activées par deux clivages au niveau de liens Asp-X, cette activation est généralement effectuée par d'autres caspases. Une telle cascade de caspases permet une amplification du signal pro-apoptotique. Cette stratégie est beaucoup utilisée pour l'activation des caspases 3, 6 et 7. Ces trois caspases effectrices sont habituellement plus abondantes et actives que les caspases à prodomaine long qui peuvent, elles, être activées par auto-protéolyse lors de l'agrégation de caspases recrutées au niveau de récepteurs via leur domaine DED ou CARD comme pour la caspase 8, ou par association avec d'autres protéines comme pour la caspase 9 (voir plus loin). Une fois activées, les caspases peuvent alors cliver plus d'une centaine de substrats. La caspase 3, qui est la plus répandue dans la cellule, est responsable de la majorité des effets apoptotiques, même si les caspases 6 et 7 agissent également. Le plus souvent, le clivage provoque l'inactivation de la protéine cible mais des activations peuvent cependant se produire lors du clivage d'un domaine régulateur négatif ou par l'inactivation d'une sous-unité régulatrice. (Hengartner, 2000)

La nucléase CAD (caspase-activated DNase) coupe l'ADN génomique entre les nucléosomes, générant ainsi des fragments d'ADN d'une longueur multiple d'environ 180 paires de bases visibles sur gel d'agarose sous forme d'une « DNA ladder ». Cette nucléase préexiste dans les cellules mais sous forme d'un complexe inactif, associée à une sous-unité inhibitrice appelée iCAD. La caspase 3 active entraîne le clivage d'iCAD provoquant ainsi la libération et l'activation de la sous-unité catalytique CAD qui peut alors exercer son activité de nucléase. (Hengartner, 2000)

Le rétrécissement et le bourgeonnement nucléaire sont notamment dus au clivage des lamines nucléaires par des caspases, alors que la perte de la forme cellulaire globale est probablement causée par le clivage de protéines du cytosquelette telles que l'actine, la fodrine et la gelsoline. (Hengartner, 2000)

Un autre substrat des caspases souvent décrit est la polyADP-ribose polymérase (PARP). PARP-1 est une enzyme nucléaire activée en réponse aux dommages à l'ADN en vue d'une réparation de ces dommages. Son activité enzymatique est de catalyser l'ajout de polymères d'ADP-ribose de 50-200 résidus à des protéines nucléaires comme les histones qui stimulent les enzymes de réparation de l'ADN. Pour cela, PARP-1 actif clive du NAD⁺. Cependant, si elle est trop active, elle provoque une déplétion en NAD⁺ et donc en ATP. Selon son seuil d'activité, PARP peut mener à la réparation de l'ADN, à l'apoptose lorsqu'il n'y a pas assez de NAD⁺ ou à la nécrose lorsqu'une insuffisance en ATP diminue l'efficacité des pompes à ions provoquant ainsi le gonflement des cellules. Lors d'un processus apoptotique, cette enzyme est clivée par des caspases. Ceci permet de préserver le pool d'ATP nécessaire à l'accomplissement de l'apoptose ainsi que d'inhiber les processus de réparation de l'ADN inutiles pour une cellule en train de mourir. (<http://fbspcu01.leeds.ac.uk>)

En temps normal, la cellule contient divers inhibiteurs de caspases afin d'éviter un processus apoptotique dans une cellule en bonne santé. Il existe au moins 8 IAP (inhibitor of apoptosis protein) chez l'homme. Parmi celles-ci, XIAP semble avoir l'activité anti-apoptotique la plus large et la plus forte. La liaison et l'inhibition des caspases par ces IAP sont médiées par leurs domaines BIR (baculovirus IAP repeats). BIR est un motif de séquence conservé d'environ 70 acides aminés qui est répété en tandem dans une classe de protéines de baculovirus. En plus des domaines BIR, c-IAP1, c-IAP2 et XIAP contiennent un domaine RING conservé à l'extrémité carboxy-terminale. Ce domaine possède une activité E3 ubiquitine ligase. Ces IAP sont ainsi capables de catalyser leur propre ubiquitination, les

ciblant ainsi vers une dégradation par le protéasome. Cependant, ils pourraient également cibler vers le protéasome les caspases 3 et 7, notamment. Des protéines comme Smac/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pI), qui, libérées de l'espace intermembranaire de la mitochondrie lors de l'apoptose, sont capables de contrecarrer l'effet inhibiteur des IAP sur les caspases. En se liant à XIAP, par exemple, Smac/Diablo déplace les caspases de XIAP, permettant ainsi leur activation. (Gewies, 2003 ; Zimmermann et al., 2001)

Des processus apoptotiques indépendants de caspases ont également été observés. Lors de la phase de décision, une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe engendre la libération du cytochrome c. Ceci provoque une interruption du flux d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire (voir Fig. I.12), causant ainsi une augmentation de la génération de dérivés réactifs de l'oxygène. Cette génération accrue de ROS (reactive oxygen species), en même temps que le découplage de la chaîne respiratoire, pourrait causer l'oxydation du NAD(P)H, la perte d'ATP, et l'oxydation/déplétion de glutathion. Tous ces changements pourraient être intrinsèquement létaux pour la cellule. (Loeffler and Kroemer, 2000 ; Gross et al., 1999)

I.1.2.3 Phase de décision

I.1.2.3.1 Libération du cytochrome c et formation de l'apoptosome

Lors de l'apoptose, on observe une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération de protéines normalement confinées dans l'espace intermembranaire, dont le cytochrome c et certaines procaspases (Fig. I.4). L'holocytocrome c, ou cytochrome c, est une hémoprotéine assemblée dans l'espace intermembranaire mitochondrial par une hème lyase qui attache un groupe hème prosthétique à l'apocytochrome c. Cet apocytochrome c est traduit dans le cytosol à partir d'un ARNm encodé par l'ADN nucléaire, puis, importé dans la mitochondrie. L'attachement de l'hème rend la réaction d'import irréversible. Une perméabilisation de la membrane interne peut également avoir lieu. Celle-ci se manifeste par une dissipation du gradient de protons responsable du potentiel transmembranaire interne de la mitochondrie ($\Delta\Psi_m$) et par une perméabilité aux solutés de masse moléculaire inférieure à environ 1,5 kDa. Ceci peut entraîner l'extrusion de petits solutés (comme le calcium et le glutathion) ainsi qu'un gonflement osmotique par influx d'eau dans la matrice pouvant engendrer la rupture de la membrane mitochondriale externe. En plus de la libération de facteurs mitochondriaux, cette perméabilisation entraîne également une perte d'homéostasie biochimique de la cellule : la synthèse d'ATP est arrêtée, des molécules redox comme le NADH, le NADPH et le glutathion sont oxydés, et beaucoup de ROS sont générés. Ces quantités de ROS augmentées provoquent l'oxydation directe de lipides, de protéines, et d'acides nucléiques. (Kroemer and Reed, 2000 ; Loeffler and Kroemer, 2000 ; Gewies, 2003)

Lorsque le cytochrome c est libéré, il s'associe avec Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), qui réside dans le cytosol, et induit son oligomérisation. Ceci permet alors, avec l'aide d'ATP, le recrutement de la procaspase 9 via des interactions CARD-CARD entre le prodomaine de la caspase 9 et Apaf-1, pour former l'apoptosome (Fig. I.4). Sept molécules de chaque type s'assemblent pour former un apoptosome heptamérique. Contrairement à d'autres caspases, la procaspase 9 ne semble pas être activée simplement par clivage mais son activation nécessiterait la liaison à Apaf-1. L'apoptosome recrute alors 7 procaspases 3 qui sont clivées et activées par les caspases 9 actives, puis libérées. La caspase 3 active va alors pouvoir cliver ses substrats et provoquer le phénotype apoptotique observé. D'autres protéines, comme les protéines mitochondriales de choc thermique hsp10 et hsp60

(heat-shock protein), pourraient également intervenir dans ce complexe. (Zimmermann et al., 2001 ; Kroemer and Reed, 2000 ; Gewies, 2003)

Plus de 50 protéines mitochondriales différentes dont AIF (apoptosis inducing factor), Smac/Diablo, l'adénylate kinase, l'endonucléase endoG, Htr/Omi ainsi que les procaspases 2, 3 et 9 sont également libérées lors de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. AIF, une flavoprotéine possédant une activité apoptotique puissante, transloque alors de la mitochondrie vers le noyau où elle active une DNase qui serait responsable de manifestations indépendantes de caspases de l'apoptose nucléaire. L'endonucléase G contribue également à la fragmentation de l'ADN. Smac/Diablo favorise l'activation des caspases en s'associant avec l'apoptosome et en inhibant les IAP. Enfin, Htr/Omi contribue également à inhiber les IAP. (Hengartner, 2000; Ferri and Kroemer, 2001; Adams, 2003)

Il faut cependant noter que, malgré l'importance de ce processus, la formation d'un apoptosome semble dispensable dans plusieurs types cellulaires lors d'une apoptose induite par certains stimuli (voir point I.1.2.4.1). (Adams, 2003)

I.1.2.3.2. Hypothèses concernant la perméabilisation membranaire mitochondriale

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire vers le cytosol lors de l'apoptose. Il y aurait ouverture d'un pore, le PTP (permeability transition pore), qui permettrait soit l'entrée d'eau et de solutés dans la mitochondrie, le gonflement de l'organite, la rupture de sa membrane externe et donc la sortie de protéines de manière passive, soit le passage direct des protéines à travers ce pore. Dans tous les cas, l'ouverture du PTP dépendrait de l'activation de membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (voir point I.1.3). En ce qui concerne les protéines constituant ce pore, diverses hypothèses ont également été émises. La première découle de l'observation de similarités structurales entre la protéine pro-apoptotique Bcl-X_L et une sous-unité de la toxine diphtérique qui forme un pore. Il a alors été suggéré que les protéines de la famille Bcl-2 pourraient agir en s'insérant et s'oligomérisant dans la membrane mitochondriale externe pour former ainsi des canaux après changement conformationnel. Les membres de la famille Bcl-2 interagissant avec beaucoup de protéines, un second modèle a été décrit, dans lequel les membres pro-apoptotiques recruteraient d'autres protéines membranaires de la mitochondrie pour former un canal à grand pore. VDAC (voltage-dependent anion channel) et ANT (adenine nucleotide translocator), des protéines très abondantes en membrane mitochondriale externe et interne respectivement, seraient de bons candidats. Dans un troisième modèle, les signaux apoptotiques altéreraient la physiologie mitochondriale (l'échange d'ions ou la phosphorylation oxydative par exemple) provoquant un gonflement des organites ayant pour résultat la rupture physique de la membrane mitochondriale externe et la libération passive de protéines intermembranaires dans le cytosol. (Antonsson and Martinou, 2000)

Le squelette du PTPC (permeability transition pore complex) est décrit comme étant formé de VDAC en membrane externe et d'ANT (normalement un antiporteur ADP/ATP strictement spécifique) en membrane interne. Ces deux protéines sont connues pour former des pores non spécifiques, soit seules, soit en collaboration avec des protéines comme Bax. D'autres protéines y seraient également associées comme l'hexokinase II (attachée à VDAC sur la face cytosolique de la membrane externe), la créatine kinase mitochondriale (de l'espace intermembranaire), la cyclophiline D (de la matrice) et Bcl-2. Une interaction avec le récepteur benzodiazépine périphérique dans la matrice est également suggérée. La constitution et les modalités d'ouverture de ce pore, qui a un rôle fondamental dans de

nombreux processus apoptotiques, ne sont donc pas encore bien comprises. (Loeffler and Kroemer, 2000; Hengartner 2000; Kroemer and Reed, 2000)

I.1.2.4 Phase d'initiation

Les signaux inducteurs de l'apoptose peuvent être classés en trois catégories principales : la liaison d'un ligand sur les récepteurs de mort de la famille du TNFR (tumor necrosis factor receptor), les carences en facteurs de croissance trophiques qui interagissent avec un récepteur en membrane plasmique, et des signaux internes à la cellule dont les dommages à l'ADN est l'exemple le plus connu. Différentes molécules ont également été décrites comme induisant la perméabilisation membranaire mitochondriale ; citons notamment le calcium, certains médiateurs lipidiques, les ROS, des produits de peroxydation lipidique, ainsi que le NO (oxyde nitrique). (Kroemer and Reed, 2000 ; Ferri and Kroemer, 2001; Karpnich et al., 2001)

I.1.2.4.1 Les récepteurs de mort de la famille du TNFR

Cette famille de récepteurs inclut TNFR1, Fas/CD95, DR3/WSL ainsi que les récepteurs TRAIL/Apo-2L (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Les membres de cette famille sont caractérisés par 2 à 5 copies de répétitions riches en cystéines extracellulaires qui leur permettent de reconnaître leur ligand avec spécificité. Ils possèdent également un domaine intracellulaire situé dans la partie carboxy-terminale du récepteur et appelé DD (death domain). Ce DD est responsable du couplage du récepteur de mort, quand celui-ci est lié par un ligand, soit à une cascade de caspases menant à l'induction de l'apoptose, soit à l'activation de voies de kinases provoquant l'expression de gènes dépendants de NF-κB (nuclear factor κB) et/ou d'AP1 (activator protein 1). (Zimmermann et al., 2001 ; Gewies, 2003)

Fas est une molécule glycosylée située à la surface des cellules. Il s'agit d'un récepteur transmembranaire de type I qui peut être exprimé par différents types cellulaires. La liaison de ce récepteur par FasL (Fas-ligand) provoque sa trimérisation et la formation rapide d'un complexe de transduction du signal pouvant induire la mort. Des protéines adaptatrices, FADD (Fas-associated death domain) dans ce cas, sont recrutées. Celles-ci possèdent un DD qui interagit avec le DD du récepteur. FADD contient également un DED qui permet le recrutement de la procaspase 8 (ou 10) via une interaction homotypique DED-DED. Le complexe alors formé au niveau du récepteur est appelé DISC (death inducing signaling complex) (Fig. I.5). Dans cet état de proximité, l'activité protéase intrinsèque faible des procaspases 8 est suffisante pour permettre leur activation par clivage autocatalytique. Ces caspases 8 actives peuvent alors activer directement la procaspase 3, ou bien cliver Bid, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, en tBid (Bid tronqué). Ce clivage de Bid augmente de manière considérable son activité pro-apoptotique. Il va alors, après myristoylation, transloquer vers la mitochondrie et induire, probablement via une interaction avec Bax ou Bak, la libération du cytochrome c et l'activation de caspases effectrices menant à la mort de la cellule (Fig. I.6). (Zimmermann et al., 2001 ; Hengartner, 2000 ; Gewies, 2003 ; Jiang and Wang, 2004)

Les lymphocytes T cytotoxiques exprimant FasL peuvent exercer leurs effets tueurs sur des cellules cibles comme celles qui sont infectées par des virus et qui expriment Fas (Fig. I.7). Ces lymphocytes peuvent également utiliser la perforine et le granzyme B pour, respectivement, faire des pores en membrane plasmique et activer des caspases en vue de l'élimination de ces cellules cibles. (Zimmermann et al., 2001)

DR3 lie également FADD et a besoin de cet adaptateur pour induire l'apoptose. TNFR1 interagit quant à lui avec l'adaptateur TRADD (TNF-R-associated death domain) par des interactions DD-DD. TRADD peut alors recruter FADD qui va permettre l'activation de la caspase 8 ou TRAF, pouvant ainsi mener à une voie de survie (Fig. I.8). Les cellules ayant la capacité d'induire de telles voies apoptotiques directes et principalement dépendantes de caspases appartiennent aux cellules dites de type I. Dans les cellules de type II, l'apoptose médiée par un récepteur de mort doit passer par une voie mitochondriale incluant tBid. (Gewies, 2003 ; Zimmermann et al., 2001 ; Jiang et al., 2004)

Lorsque la liaison du récepteur de mort active une voie menant à l'activation de NF- κ B, ce facteur de transcription induit l'expression de TRAF-1 (TNF-R-associated factors), TRAF-2 et c-IAP. Une fois lié au récepteur, TRAF est capable de recruter c-IAP, inhibant ainsi la signalisation apoptotique. (Zimmermann et al., 2001)

I.1.2.4.2 Privation de facteurs de croissance

En présence d'un facteur de survie, Bad, une autre protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, est phosphorylée au niveau de résidus sérines. Ainsi phosphorylé, Bad est séquestré dans le cytosol par la protéine 14-3-3. Différentes kinases sont capables de phosphoryler Bad selon le récepteur qui est activé. Lorsque la cellule subit une privation en IL-3, par exemple, Bad est déphosphorylé et peut alors s'associer avec Bcl-X_L et/ou Bcl-2, favorisant ainsi la perméabilisation membranaire mitochondriale (Fig. I.9). Raf-1, une protéine associée à la membrane externe stimule également la phosphorylation et l'inactivation de Bad. Inversement, dans l'apoptose induite par le calcium, la phosphatase calcineurine déphosphoryle Bad, restaurant sa capacité à lier les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et à provoquer la perméabilisation mitochondriale. Une dimérisation de Bax a également été décrite en réponse à une privation en facteurs de survie. (Gross et al.; 1999)

I.1.2.4.3 Dommages à l'ADN

Les réponses aux dommages à l'ADN varient énormément selon le type cellulaire. La cellule a deux possibilités : soit réparer les dommages, soit initier l'apoptose. Dans le premier cas, les extrémités d'ADN libres générées provoquent, notamment, l'activation de la protéine réparatrice PARP. Dans le second, PARP est clivée par les caspases afin d'éviter l'épuisement de la cellule. Les cassures dans l'ADN double brin sont alors perçues par des enzymes de la famille des PtdIns-3-OH kinases, en particulier ATM (ataxia teleangiectasia mutated), DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) ou ATR (ataxia teleangiectasia Rad3 related) lorsque les dommages sont induits par les ultraviolets. Ces trois enzymes, ainsi que Chk1 et Chk2, les kinases en aval activées respectivement par les ultraviolets et les radiations ionisantes, phosphorylent des résidus sérines du côté amino-terminal du facteur de transcription suppresseur de tumeurs p53. Cette phosphorylation de p53 peut augmenter sa fonction transactivatrice et/ou inhiber son interaction avec Mdm2. Mdm2 est une E3 ubiquitine ligase interagissant avec p53 en conditions normales pour induire sa dégradation par le protéasome. Dans ces conditions, p53 n'est donc plus dégradé, il s'accumule et peut exercer son activité qui va favoriser l'apoptose. Dans la plupart des populations de cellules répliquatives, la quantité de p53 augmente quelques minutes après les dommages à l'ADN et les premiers événements apoptotiques sont observés après quelques heures. (Rich et al., 2000 ; Ferri and Kroemer, 2001)

p53 peut initier l'apoptose en activant la transcription de membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax, Bak, Noxa et Puma, qui transloquent tous du cytosol vers la membrane mitochondriale externe où ils induisent la perméabilisation mitochondriale, et réprimer les anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-X_L ainsi que les IAP. p53 peut également transactiver d'autres gènes favorisant l'apoptose tels que APAF-1, FAS/CD95, TRAIL-R2/DR5, ainsi que des gènes menant à une augmentation de ROS. L'expression d'une autre protéine inductible par p53, Peg3/Pw1, qui n'est pas reliée à la famille Bcl-2, favorise la translocation de Bax vers la mitochondrie par un mécanisme inconnu. Finalement, p53 induit l'expression de p53AIP1, une protéine de la matrice mitochondriale dont la surexpression provoque une perte de $\Delta\Psi_m$ et l'apoptose, par un mécanisme également encore inconnu. D'autres gènes sont encore induits par p53. Citons par exemple p21 qui va bloquer la transition G1/S du cycle cellulaire en inhibant CDK2 (cyclin-dépendent kinase 2), GADD45 et des membres de la famille 14-3-3. Malgré l'importance de la régulation transcriptionnelle, p53 possède des activités indépendantes de la transcription qui ont également un rôle dans l'induction de l'apoptose. Cela pourrait impliquer la translocation de p53 vers la mitochondrie, où il interagirait avec la Hsp70 mitochondriale. (Ferri and Kroemer, 2001 ; Rich et al., 2000 ; Jin and Levine, 2001)

D'autres candidats liant les dommages à l'ADN à l'apoptose existent, comme le facteur de transcription E2F-1 qui permet un mécanisme de mort en absence de p53. Il a également été décrit que la proto-oncoprotéine c-Abl, une tyrosine kinase, est activée par phosphorylation, par un mécanisme dépendant d'ATM, ce qui pourrait contribuer à la stabilisation de p53. (Rich et al., 2000 ; Ferri and Kroemer, 2001)

I.1.3 Les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Chez les mammifères, la famille des protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) contient plus de 30 membres dont l'homologie de séquence en acides aminés globale entre les différents membres est faible. L'homologie est confinée dans quatre régions spécifiques appelées domaines d'homologie Bcl-2 (BH) et qui correspondent à des segments en hélice α . Tous les membres de cette famille possèdent au minimum un domaine BH. Ces protéines peuvent être classées en 3 catégories selon leur structure et leur fonction (Fig. I.10). La première contient les membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, A1 et Mcl-1 qui contiennent au moins les domaines BH1 et BH2. Au sein de la deuxième, on retrouve des membres pro-apoptotiques comme Bax, Bak et Bok qui partagent des homologies de séquence en BH1, BH2 et BH3 mais pas BH4. Enfin, la troisième contient les membres pro-apoptotiques « BH3-only » qui possèdent uniquement le domaine BH3. Cette dernière catégorie inclut des protéines telles que Bid, Bad, Bim, Bik, Bnip3, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk et Spike. Le domaine BH3 semble être le domaine de mort essentiel à la fonction pro-apoptotique de ces protéines. Les protéines anti-apoptotiques résident principalement dans la membrane mitochondriale externe alors que les membres pro-apoptotiques peuvent être soit cytosoliques soit en membrane mitochondriale, ou bien même dans l'enveloppe nucléaire ou le réticulum endoplasmique. (Zimmermann et al., 2001 ; Gross et al., 1999 ; Antonsson and Martinou, 2000 ; Gewies, 2003)

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent former un grand nombre d'hétérodimères différents permettant une régulation complexe du processus apoptotique. Bcl-2, par exemple, est connu pour interagir avec plus de 13 protéines différentes. On peut néanmoins considérer, en première approximation, que l'hétérodimérisation conduit à une neutralisation mutuelle des protéines pro- et anti-apoptotiques liées. Suivant cette hypothèse, les cellules contenant un plus grand nombre de protéines pro-apoptotiques seront plus sensibles à la mort que celles

possédant un excès de protéines anti-apoptotiques. Des homodimères de protéines pro-apoptotiques existent également et pourraient être impliqués dans la formation des pores dans la membrane mitochondriale externe. Un autre rôle des protéines pro-apoptotiques, en plus de leur inhibition des protéines anti-apoptotiques, serait de libérer Apaf-1, qui est normalement lié par Bcl-X_L, et de contribuer ainsi à l'activation de la caspase 9. (Gross et al., 1999 ; Hengartner, 2000 ; Antonsson and Martinou, 2000)

Ces protéines peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles modifiant leur activité. La phosphorylation est notamment utilisée pour moduler la séquestration de Bad par la protéine 14-3-3 mais affecte également l'activité anti-apoptotique de Bcl-2, sans doute via un changement de conformation. En réponse à des agents génotoxiques, la protéine kinase activée par les stress (JNK/SAPK, c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase) transloque vers la mitochondrie où elle phosphoryle Bcl-X_L, menant ainsi probablement à son inactivation (Gross et al., 1999 ; Kroemer and Reed, 2000). Lors de l'apoptose, différents membres de la famille Bcl-2 transloquent vers la mitochondrie, comme Bim, par exemple, qui est une protéine « BH3 only » normalement localisée en association avec les microtubules par interaction avec les chaînes légères de dynéine mais qui s'en dissocie lors de la réception de certains signaux de mort pour transloquer vers la mitochondrie. A cet endroit, elle interagirait avec Bcl-2 pour antagoniser son activité anti-apoptotique. La localisation sub-cellulaire de la protéine inductrice d'apoptose Bid dépend d'un clivage par la caspase 8 (Kroemer and Reed, 2000 ; Gross et al., 1999). Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 constitutivement actifs seraient également régulés au niveau transcriptionnel. La transcription de Bax, par exemple, répond à une induction de p53. Certains gènes codants pour des protéines anti-apoptotiques sont également régulés transcriptionnellement (Gross et al., 1999). Les caspases 1 et 3 digèrent Bcl-X_L et Bcl-2 respectivement, convertissant ainsi des protéines anti-apoptotiques en médiateurs pro-apoptotiques. Ces différents événements montrent l'importance de mécanismes variés influençant la localisation subcellulaire, la fonction et/ou l'activité des membres de famille Bcl-2. (Kroemer and Reed, 2000)

Pendant l'apoptose, il y a activation de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Celles-ci vont affecter d'une manière ou d'une autre l'intégrité mitochondriale. Bax et Bak sont centraux dans ce mécanisme. Bax est un monomère cytosolique dans les cellules viables mais, au cours du processus apoptotique, il change de conformation, s'intègre dans la membrane mitochondriale externe et s'oligomérisé. Par un mécanisme encore controversé, les oligomères de Bax et/ou de Bak provoqueraient ou contribueraient à la perméabilisation de cette membrane. Les membres anti-apoptotiques de cette même famille séquestrent les protéines pro-apoptotiques en se liant à leur domaine BH3 et en empêchant ainsi l'activation/oligomérisation de Bax et/ou Bak. Les protéines « BH3 only » sont nécessaires pour l'activation de la fonction pro-apoptotique de ces deux protéines. D'un autre côté, l'effet tueur des « BH3 only » dépend de Bax/Bak. Les protéines « BH3 only » agiraient donc en amont de ces deux protéines. Il a été proposé que Bid et Bim possèdent des domaines BH3 « Bid-like » qui peuvent médier directement l'oligomérisation de Bax/Bak, alors que Bad et Bik possèdent des domaines BH3 « Bad-like » qui n'agissent pas directement sur Bax/Bak mais interagissent préférentiellement avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-X_L. Dans ce cas, Bad/Bik activé pourrait être capable de déplacer Bid/Bim de la poche de liaison des protéines anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-X_L et – libéré de cette manière - Bid/Bim pourrait provoquer l'oligomérisation de Bax/Bak et la libération du cytochrome c. En conclusion, des signaux de stress apoptotiques spécifiques déclenchent l'activation de protéines « BH3 only » particulières qui interagissent alors avec des membres anti-apoptotiques sur la membrane mitochondriale externe (mais aussi sur le noyau et le réticulum endoplasmique), provoquant la libération de facteurs pro-apoptotiques Bax-like. Ces facteurs subissent un changement

conformationnel (peut-être avec l'aide de protéines « BH3 only ») et s'insèrent dans la membrane mitochondriale externe où ils provoquent une perméabilisation ainsi que la libération de facteurs engendrant un phénotype apoptotique. (Gewies, 2003 ; Zimmermann et al., 2001 ; Adams, 2003)

Les interactions et la régulation des fonctions des protéines de la famille Bcl-2 ne sont pas encore pleinement comprises. Il est cependant évident qu'il s'agit de protéines centrales dans un grand nombre de processus apoptotiques, principalement au niveau de la mitochondrie. (Fig. I.11)

I.1.4 Apoptose et cancer

Les défauts dans l'apoptose sont une des causes de la tumorigenèse. On en retrouve dans la quasi-totalité des cellules tumorales. La disruption de la voie apoptotique intrinsèque est très courante. Le gène suppresseur de tumeur p53 est le gène le plus souvent muté dans les tumeurs humaines. De plus, des mutations fonctionnelles ou une expression altérée d'effecteurs en aval (Bax, Bak, Apaf-1) ou de régulateurs en amont (ATM, Chk2, Mdm2) de p53 se retrouvent fréquemment dans les tumeurs humaines. Les membres de la famille Bcl-2 sont également souvent altérés. Bcl-2 est surexprimé dans différents cancers et différentes protéines pro-apoptotiques de la famille ainsi que des régulateurs en amont sont parfois inactivés. Des changements locaux dans l'expression de protéines du PTPC pourraient également contribuer à la résistance à l'apoptose de certains cancers. (Johnstone et al., 2002)

Des mutations altérant le processus post-mitochondrial sont également décrites même si elles semblent moins fréquentes que celles ciblant les composants en amont du programme apoptotique. Le silençage d'APAF-1, par exemple est observé dans des mélanomes métastatiques. La surexpression d'IAP et d'HSP, qui peuvent inhiber l'activation de la caspase 9, existe également dans les tumeurs humaines. (Johnstone et al., 2002)

En ce qui concerne les disruptions tumorigéniques dans la voie du récepteur de mort, des mutations de CD95 dans la lignée germinale engendrent une survie inappropriée de lymphocytes T provoquant alors le syndrome autoimmun lymphoprolifératif (ALPS, autoimmune lymphoproliferative syndrome). L'inactivation de voies de récepteur de mort pourrait donc permettre d'échapper à la réponse immune et de fournir un avantage de survie pour des cellules tumorales en développement. Certaines cellules cancéreuses du poumon et du colon sécrètent des quantités élevées de molécules appât solubles qui se lient à FasL, l'empêchant ainsi de se lier à Fas. D'autres cellules cancéreuses expriment de grandes quantités de FasL et peuvent tuer les lymphocytes T cytotoxiques qui essaieraient de les tuer parce que ces derniers expriment également Fas. (Johnstone et al., 2002 ; Kroemer and Reed, 2000)

L'apoptose est un processus régulé à de nombreux niveaux, et des mutations disruptant chacune de ces étapes ont été détectées dans les cellules tumorales. De plus, certains types de cancers ont une fréquence accrue de mutations dans l'ADN mitochondrial. Des délétions complètes de ce génome pourraient également réduire la susceptibilité des cellules à des agents induisant l'apoptose. Toutes ces déficiences du processus apoptotique permettent aux cellules tumorales de résister aux thérapies anti-cancéreuses et principalement à la chimiothérapie qui agit souvent en induisant l'apoptose. (Johnstone et al., 2002 ; <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html> ; Kroemer and Reed, 2000)

I.2 Hypoxie

I.2.1 Importance et utilisation de l'oxygène

L'oxygène est une molécule très importante pour la majorité des êtres vivants. Les premiers organismes sont apparus il y a quatre milliards d'années quand l'atmosphère avait un contenu en oxygène plusieurs milliers de fois inférieur au niveau actuel. Il y a un à deux milliards d'années, un changement majeur s'est produit lorsque les organismes photosynthétiques ont pris de plus en plus d'importance. La teneur en oxygène atmosphérique s'éleva alors graduellement jusqu'à un niveau proche des 21 % connus aujourd'hui. (Gleadle and Ratcliffe, 2001)

Cette molécule est principalement utilisée pour la production d'énergie par un processus appelé « respiration aérobie ». Ce processus, contrôlé de manière enzymatique, utilise de l'énergie chimique pour produire de l'ATP, la molécule énergétique utilisée pour la plupart des activités cellulaires. L'oxydation de substrats tels que le glucose, le pyruvate et les acides gras permet, notamment, la production de NADH et de FADH₂. Les électrons de ces deux molécules vont passer dans une chaîne de transporteurs d'électrons se situant dans la membrane mitochondriale interne, libérant ainsi de l'énergie conservée sous forme d'un gradient électrochimique transmembranaire de protons. A la fin de cette chaîne, quatre électrons aboutissent sur une molécule d'O₂ pour former deux molécules d'H₂O. Le retour des protons vers la matrice mitochondriale, en passant par l'ATP synthase membranaire, permet la production d'ATP à partir d'ADP par un processus appelé phosphorylation oxydative. (Fig. I.12) En plus de son importance dans la production d'énergie, l'O₂ est également utilisé dans d'autres réactions enzymatiques, notamment d'oxydation. (Gleadle and Ratcliffe, 2001)

Pendant l'embryogenèse, les organismes supérieurs développent des systèmes respiratoire et circulatoire complexes pour assurer la disponibilité de l'oxygène à toutes les cellules de l'organisme. L'oxygène étant peu soluble dans l'eau, son transport dans le sang est augmenté par sa fixation à l'hémoglobine contenue dans les globules rouges. Un système vasculaire adéquat est nécessaire pour permettre à toutes les cellules de l'organisme d'être approvisionnées en oxygène et en nutriments de manière optimale. (Gleadle and Ratcliffe, 2001 ; Gothié and Pouysségur, 2002)

I.2.2 Réaction générale de l'organisme en hypoxie

Etant donné l'importance de cette molécule, lorsque l'organisme subit un déficit en oxygène (hypoxie), il va devoir s'adapter. Ceci va se produire via des changements très rapides (de l'ordre de quelques minutes) ainsi que via des réponses plus graduelles prenant plusieurs heures et impliquant la régulation de l'expression de différents gènes. Lors de la détection d'un taux en oxygène trop faible au niveau des cellules chémoréceptrices spécialisées des corps carotidiens du système circulatoire, et des corps neuroépithéliaux situés au niveau du système respiratoire, une réponse physiologique rapide se produit. L'hypoxie provoque une inhibition des canaux à K⁺, ce qui mène à une réduction de la conductance au potassium, à une diminution du potentiel de membrane, à l'ouverture de canaux calciques et à un influx de calcium provoquant une élévation du niveau cytosolique en Ca⁺². Ce taux calcique élevé va engendrer la sécrétion de neurotransmetteurs dont la dopamine qui va stimuler le cerveau à émettre des signaux provoquant une augmentation de la respiration et du rythme cardiaque. Ceci entraîne alors une augmentation de la pression sanguine et de la saturation en oxygène, assurant une meilleure distribution tissulaire de l'oxygène. (Fig. I.13) Les cellules musculaires lisses vasculaires répondent également de manière directe à

l'hypoxie. Ceci se manifeste par une dilatation des vaisseaux périphériques et une constriction de la vasculature pulmonaire, permettant ainsi une meilleure perfusion des tissus. La contraction des myocytes est dépendante du taux calcique cytosolique. (Gleadle and Ratcliffe, 2001 ; Michiels, 2004)

Si l'hypoxie se prolonge, une augmentation du métabolisme anaérobie, c'est-à-dire la glycolyse, et du nombre de globules rouges sanguins se produira. L'érythropoïèse peut être fortement stimulée par l'hypoxie, notamment grâce à une augmentation importante de la quantité d'érythropoïétine (EPO). L'EPO est une hormone glycoprotéique synthétisée principalement au niveau du rein, qui passe ensuite dans le sang et atteint la moelle osseuse où elle va provoquer la transformation des précurseurs des globules rouges en érythrocytes. Le potentiel de captage en oxygène du sang en est ainsi augmenté. L'hypoxie va également engendrer diverses réponses en vue de compenser la rareté en oxygène, telles que l'angiogenèse, c'est-à-dire la production de vaisseaux sanguins à partir d'un réseau pré-existant, qui permet d'augmenter la densité du système vasculaire et donc « l'accessibilité » de l'oxygène, et la glycolyse anaérobie par exemple. Cette dernière permet la production d'énergie indispensable à la survie de la cellule sans l'intervention d'oxygène. Une grande partie de ces réponses sont dues à l'activation du facteur de transcription HIF-1 (hypoxia inducible factor- 1). (Gleadle and Ratcliffe, 2001 ; Gothié and Pouyssegur, 2002)

Une situation hypoxique peut avoir différentes causes : une diminution de la pression partielle en oxygène atmosphérique lors de la montée en altitude, de nombreuses maladies pulmonaires, le grossissement d'une tumeur sans néovascularisation, ... Au niveau de la mer, la pression partielle en oxygène est de 19,8 kPa alors qu'à 8848 m d'altitude elle n'est plus que de 5,7 kPa. Lors de la montée en altitude, un processus d'acclimatation se met en place. On constate notamment une augmentation de la ventilation, de la capacité de diffusion pulmonaire, de la circulation, de la quantité de globules rouges, d'hémoglobine et de myoglobine, de la densité mitochondriale, une prolifération en capillaires sanguins, un shift dans la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine vers la droite favorisant ainsi la libération d'oxygène, ainsi que l'induction d'enzymes respiratoires. De telles réponses ont lieu afin de diminuer les besoins des cellules en oxygène et leur dépendance vis-à-vis de cette molécule, ainsi que pour augmenter les apports en oxygène aux tissus. Certaines de ces réponses sont intrinsèques à toutes les cellules hypoxiques, indiquant que chaque cellule a son propre système de perception de l'oxygène, alors que d'autres sont médiées par des senseurs plus centralisés comme les corps carotidiens par exemple. Soulignons également que l'hypoxie est nécessaire pour un développement adéquat, notamment pour la vasculature rétinienne. (Gleadle and Ratcliffe, 2001 ; Guillemin and Krasnow, 1997)

I.2.3 Perception de la concentration en oxygène par la cellule

Chaque cellule, que ce soit chez les bactéries, les levures, les invertébrés ou les vertébrés, a la capacité de percevoir et de répondre à une disponibilité réduite en oxygène. Le profil d'induction de HIF-1 par l'oxygène montre que les cellules perçoivent et répondent à une gamme continue de pressions en oxygène. Différents mécanismes ont d'abord été postulés pour expliquer comment les cellules évaluent cette concentration en O₂. Dans un de ces modèles, l'oxygène se lierait au senseur de manière directe. C'est une technique utilisée par certains organismes. Pour les cellules mammaliennes, une hémoprotéine ou une protéine contenant des groupes fer-souffre ont été proposées comme senseurs. Alternativement, des dérivés de l'oxygène comme les anions superoxydes (O₂⁻), produits notamment par la NAD(P)H oxydase, ou le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produit à partir de O₂⁻ par la superoxyde dismutase (SOD), pourraient être perçus. Lorsque la concentration en O₂ diminue,

ce modèle prédit que la production de ROS diminue, fournissant ainsi le signal indiquant la diminution en oxygène. Un autre modèle propose que, en conditions hypoxiques, la réduction d'O₂ en H₂O par le complexe IV de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (la cytochrome c oxydase) est inhibée, provoquant la libération d'électrons en amont, au complexe III, et la génération d'O₂⁻ au niveau mitochondrial ; un résultat inverse au modèle précédent. Les radicaux dérivés de l'oxygène sont très actifs et peuvent modifier des macromolécules de diverses façons, fournissant de nombreuses possibilités de processus de transduction du signal. Dans chacun de ces modèles, l'oxygène ou ses dérivés peuvent soit interagir directement avec les protéines effectrices (comme les canaux à K⁺ ou la protéine HIF) ou bien activer une voie de transduction du signal menant à l'activation de l'effecteur. Une autre possibilité serait la perception de changements au niveau de métabolites, comme la quantité d'ATP, par exemple, qui peut notamment influencer certains canaux ioniques. La plupart des senseurs à oxygène découverts chez les bactéries contiennent soit un hème, soit du fer non hémique. Il est intéressant de constater que la protéine HIF-1 mammalienne est activée par la chélation du fer ainsi que par l'hypoxie. La perception de l'oxygène chez les mammifères impliquerait donc également un centre de fer. En ce qui concerne l'activation de HIF-1, le senseur a été déterminé ; il s'agit d'une prolyl-hydroxylase. Etant donné l'importance fondamentale de l'homéostasie de l'oxygène pour la survie, de multiples voies de transduction du signal de l'hypoxie et des voies modulatrices transversales peuvent exister. (Semenza, 1999 ; Gothié and Pouyssegur, 2002 ; Gleadle and Ratcliffe, 2001 ; Brahimi-Horn et al., 2001)

En ce qui concerne l'inhibition des canaux au K⁺ dans les corps carotidiens et neuroépithéliaux, le senseur de l'oxygène serait une protéine contenant un hème associée à ces canaux. Dans les corps neuroépithéliaux, il y aurait une implication de NADPH oxydases. En normoxie, l'oxydase générerait des ROS qui favoriseraient l'activité des canaux alors qu'en conditions hypoxiques, le taux de ROS diminuerait, induisant ainsi l'inhibition des canaux au K⁺. (Michiels, 2004)

I.2.4 Réponses cellulaires à l'hypoxie

La réponse classique d'une cellule subissant un manque d'oxygène a d'abord été décrite comme une augmentation substantielle de la consommation en carbohydrates permettant ainsi de compenser leur utilisation inefficace dans ces conditions. C'est ce qu'on appelle « l'effet Pasteur ». Lorsque l'oxygène n'est pas disponible comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire, la cellule doit abandonner la phosphorylation oxydative et compter uniquement sur la glycolyse pour la production d'énergie. Le passage vers ce métabolisme anaérobie est régulé par des métabolites de la voie énergétique agissant sur les enzymes de la glycolyse. Par exemple, la phosphofructokinase est inhibée allostériquement par l'ATP et cette inhibition est réversée par l'ADP et l'AMP. Néanmoins, les cellules hypoxiques perçoivent le taux d'oxygène diminuant et mettent en place une réponse adaptée bien avant que leur pool d'ATP ne soit réduit. Si la disponibilité en nutriments est suffisante, la cellule peut survivre avec la glycolyse comme seul mode de production d'énergie, même s'il s'agit d'un moyen bien moins efficace que la phosphorylation oxydative. Cependant, la cellule doit limiter ses dépenses énergétiques. La synthèse de protéines et d'ARN/ADN sont les premiers processus à être inhibés. Les pompes au Na⁺/K⁺ et au Ca⁺², qui consomment de 20 à 80 % de l'énergie cellulaire au repos dans un environnement normal, ont, quant à elles, la priorité. Le maintien de l'homéostasie ionique est en effet fondamental, car si ces pompes ne fonctionnent plus ou de manière insuffisante, une dépolarisation membranaire a lieu engendrant un influx calcique non contrôlé menant à l'activation de phospholipases et protéases dépendantes du calcium. La sensibilité à l'hypoxie

dépend également du type cellulaire : une cellule neuronale qui utilise 80 % de son ATP pour l'homéostasie ionique sera plus sensible à l'hypoxie qu'un hépatocyte qui n'en utilise que 20 % pour cela. (Guillemin and Krasnow, 1997 ; Michiels, 2004)

Une réponse cellulaire mammalienne universelle à une disponibilité réduite en oxygène implique l'activation de HIF-1 (voir point I.2.5). Il s'agit sans doute du facteur de transcription le plus important et le plus décrit pour l'hypoxie. Cependant, d'autres facteurs de transcription, plus pléiotropiques, sont activés dans ces conditions. Citons notamment AP-1, p53 et NF- κ B. Beaucoup d'adaptations cellulaires viendraient donc de la régulation de l'expression de gènes. Néanmoins, de nombreuses modifications post-traductionnelles de protéines associées avec le métabolisme énergétique, la réponse aux stress, les dommages cellulaires, le développement, et l'apoptose sont également décrits. (Guillemin and Krasnow, 1997 ; Faller, 1999 ; Kumar and Klein, 2004)

Même si, apparemment, toutes les cellules possèdent la même voie générale, la réponse finale varie selon le type cellulaire. Tandis que la plupart des cellules exposées à une hypoxie prolongée induiront l'expression de gènes glycolytiques et de différents facteurs angiogéniques, seules les cellules du foie et des reins induisent l'EPO. Par ailleurs, l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme du NO et de l'endothéline, deux médiateurs contribuant au tonus vasculaire, peut être modulée par l'hypoxie dans les cellules pulmonaires. (Guillemin and Krasnow, 1997 ; Gleadle and Ratcliffe, 2001)

I.2.5 Le facteur de transcription HIF-1

Le facteur de transcription HIF-1 est composé de deux sous-unités : HIF-1 α , qui est spécifique de la réponse hypoxique, et HIF-1 β , également appelé ARNT1 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), qui est impliqué dans les phénomènes de détoxification des cellules. Il s'agit donc d'un hétérodimère. La séquence protéique de ces deux gènes est très conservée ; il y a 90 % d'homologie entre les séquences protéiques de l'homme, du rat et de la souris. HIF-1 α est une protéine essentielle au développement qui est fortement exprimée de manière constitutive et ubiquiste mais qui subit diverses régulations modifiant sa stabilité et son activité transcriptionnelle. Son temps de demi-vie est inférieur à 5 minutes en normoxie. Par contre, la sous-unité ARNT est exprimée de manière constitutive et présente un taux d'expression relativement constant dans le noyau, quelle que soit la concentration en oxygène. Des protéines HIF-2 α et HIF-3 α ayant des fonctions recouvrant partiellement celles de HIF-1 α sont également décrites. (Gothié and Pouyssegur, 2002 ; Brahimi-Horn et al., 2001)

Lors de la stabilisation et de l'activation de HIF-1 α , cette sous-unité dimérise avec ARNT et l'hétérodimère se lie à sa séquence consensus, appelée HRE (hypoxia responsive element), dans le promoteur ou l'*enhancer* de ses gènes cibles. Plus de 60 gènes cibles potentiels ont été décrits pour ce facteur de transcription (Fig. I.14). Pour la majorité de ces gènes, l'expression est induite par l'hypoxie d'une façon spécifique du type cellulaire. C'est l'interaction fonctionnelle de HIF-1 avec d'autres facteurs de transcription qui déterminerait le sous-groupe de gènes cibles qui est activé dans une cellule hypoxique particulière. Parmi ces gènes cibles, citons l'EPO et le VEGF (vascular endothelial growth factor) qui stimulent, respectivement, la production de globules rouges et l'angiogenèse, permettant ainsi d'augmenter l'apport en oxygène ; la transferrine, qui intervient dans l'érythropoïèse ; des transporteurs au glucose et des enzymes glycolytiques qui facilitent la production d'ATP en absence d'O₂, ainsi que la tyrosine hydroxylase. De nombreux autres gènes régulant notamment l'érythropoïèse, l'angiogenèse, la glycolyse, le métabolisme du glucose, la survie, la prolifération cellulaire, le tonus vasculaire, le métabolisme du fer, la synthèse de

neurotransmetteurs et la synthèse d'hème sont également des gènes cibles de HIF-1. Plusieurs facteurs de croissance dont IGF2 (insulin-like growth factor 2) et TGF- α (transforming growth factor α) sont également régulés par ce facteur. L'ensemble de ces gènes permet une réponse adaptative à l'hypoxie au niveau cellulaire mais également à l'échelle de l'organisme. (Gleadle and Ratcliffe, 2001 ; Semenza, 2003 ; Gothié and Pouyssegur, 2002 ; Wenger, 2002)

La synthèse de HIF-1 α s'effectue de manière constitutive mais elle peut également être régulée via les voies des PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase) et ERK (MAPK, mitogen activated protein kinase). La cascade d'activation complète de HIF-1 inclut la phosphorylation post-traductionnelle de HIF-1 α , la dissociation de la chaperone hsp90, la translocation nucléaire de HIF-1 α , son hétérodimérisation avec ARNT, la liaison à l'ADN, le recrutement de cofacteurs transcriptionnels généraux et spécifiques de tissus, et la transactivation des gènes cibles (Fig. I.15). Chaque étape peut être sous le contrôle de la concentration en oxygène et de divers autres paramètres. HIF-1 est principalement activé en conditions hypoxiques mais d'autres facteurs tels que des cytokines (comme l'IGF et le PDGF (platelet-derived growth factor)), des hormones (comme l'insuline) et le NO conduisent également à son activation. En normoxie, la sous-unité HIF-1 α est très instable. Elle est hydroxylée sur deux prolines par des prolines hydroxylases dépendantes de l'oxygène, du fer et de 2-oxoglutarate. Cette hydroxylation permet l'interaction avec la protéine de von-Hippel-Lindau (pVHL) qui fait partie d'un complexe, avec les élongines B et C et la protéine CUL-2, qui possède une activité E3 ubiquitine ligase. HIF-1 α est ainsi ubiquitinylé puis dégradé par le protéasome. En hypoxie, l'hydroxylation n'a pas lieu et HIF-1 α qui n'est donc plus dégradé, s'accumule. Une fois stabilisée, cette sous-unité transloque dans le noyau grâce à ses deux signaux de localisation nucléaire et se fixe à HIF-1 β /ARNT1 ainsi qu'à des cofacteurs comme p300/CBP pour activer la transcription des gènes cibles possédant des HRE dans leur promoteur. En normoxie, l'interaction avec CBP/p300 est en outre inhibée via l'hydroxylation d'un résidu asparagine. Diverses modifications (réduction et phosphorylation) sont encore requises pour augmenter l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Notons également qu'un HRE fonctionnel contient souvent des sites de liaisons pour d'autres facteurs de transcription. HIF-1 coopère notamment avec AP1 pour induire la transcription du VEGF. (Wenger, 2002 ; Semenza, 2003 ; Gothié and Pouyssegur, 2002 ; Brahimi-Horn et al., 2001 ; Michiels, 2004)

I.2.6 Hypoxie et cancer

Lors de la croissance rapide d'une tumeur, son centre n'est plus suffisamment irrigué par les vaisseaux sanguins. En effet, lorsque les cellules se multiplient rapidement jusqu'à atteindre une taille de plus de 1 mm³, les cellules se trouvant au centre de la tumeur sont trop éloignées des vaisseaux sanguins pour être correctement irriguées. Ce manque d'irrigation engendre un microenvironnement hypoxique, acide et pauvre en nutriments. L'hypoxie provoque alors des changements adaptatifs, notamment via la régulation de l'expression de gènes impliqués, soit dans l'augmentation de la disponibilité en oxygène vers les tissus, soit dans une diminution de la consommation cellulaire d'oxygène en activant la glycolyse. L'augmentation de la disponibilité en oxygène et de l'apport en nutriments est principalement accomplie via une néoangiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau existant (Fig. I.16). Le facteur de transcription HIF-1 est un facteur clé dans l'angiogenèse car il permet la transactivation des gènes codants pour des facteurs de croissance pro-angiogéniques comme le VEGF. On remarque que HIF-1 α est surexprimé dans de nombreux cancers humains. Des associations significatives entre sa surexpression et la mortalité des patients ont été montrées dans des cancers du cerveau, du sein, du cervix, de l'oropharynx, de l'ovaire et de l'endomètre. Certains auteurs ont néanmoins relevé le

contraire, notamment en ce qui concerne des cancers de la tête et du cou. En fait, les effets d'une surexpression de HIF-1 α dépendent du type de cancer et de la présence ou non d'altérations génétiques qui affectent la balance entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques. En plus de l'angiogenèse, HIF-1 joue également un rôle dans l'augmentation de la glycolyse, le maintien du pH, et sans doute d'autres étapes clé dans la progression des tumeurs. Si ces nouveaux vaisseaux sanguins permettent l'apport de nutriments et d'oxygène, ils vont également favoriser la formation de métastases. Différents médicaments ont un effet anticancéreux, au moins partiellement via leur inhibition de HIF-1. Une augmentation de l'activité de ce facteur de transcription pourrait également contribuer à la sélection clonale. En effet, normalement, l'hypoxie sévère arrête la croissance en stoppant la prolifération cellulaire et/ou en induisant l'apoptose. L'hypoxie tumorale peut ainsi permettre la sélection des cellules qui ont perdu les mécanismes de contrôle de la croissance et qui possèdent donc un plus grand potentiel malin. (Gleadle and Ratcliffe, 2001 ; Semenza, 2003)

Un des exemples les plus frappants du rôle de HIF-1 dans l'angiogenèse et la progression des tumeurs est observé lors de la perte de fonction de la protéine de von Hippel-Lindau. Dans ce cas, HIF-1 α n'est plus ciblé vers le protéasome et s'accumule, provoquant l'activation constitutive de ses gènes cibles. VHL est un gène suppresseur de tumeurs qui, lorsqu'il est muté, peut donner lieu à la maladie de von Hippel-Lindau caractérisée par une susceptibilité augmentée à des tumeurs très vascularisées. (Brahimi-Horn et al., 2001 ; Gleadle and Ratcliffe, 2001)

Le microenvironnement hypoxique des tumeurs solides corrèle avec une malignité augmentée, la possibilité de formation de métastases et un pronostic peu favorable pour le patient. De telles tumeurs sont résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie. La résistance à la radiothérapie provient probablement du fait que les principaux médiateurs de la cytotoxicité des radiations ionisantes nécessitent la présence d'oxygène. La résistance à la chimiothérapie peut être due à une mutabilité augmentée, à un contact limité de certaines cellules tumorales éloignées des vaisseaux sanguins avec les médicaments anti-cancéreux apportés par ces vaisseaux, ou à un faible taux de croissance des cellules hypoxiques qui ne répondent pas aux médicaments anticancéreux ciblant les cellules se divisant rapidement. De plus, un rôle direct de HIF-1 n'est pas à exclure. (Brahimi-Horn et al., 2001 ; Gleadle and Ratcliffe, 2001)

I.3 Hypoxie et apoptose

Selon le type cellulaire et les conditions expérimentales, le facteur de transcription HIF-1 et/ou l'hypoxie sont pro- ou anti-apoptotiques. En règle générale, une hypoxie de faible intensité et de courte durée maintient la viabilité cellulaire, notamment via l'activité transcriptionnelle de HIF-1, alors qu'une hypoxie sévère et prolongée provoque la mort. Ces deux processus opposés pourraient notamment avoir lieu suite à une différence de phosphorylation de HIF-1 α . (Fig. I.17) (Suzuki et al., 2001 ; Schmid et al, 2004 ; Piret et al., 2002b)

I.3.1 Hypoxie comme facteur anti-apoptotique

Puisque beaucoup d'actions contrôlées par HIF-1 favorisent la survie cellulaire, on peut se demander si HIF-1 et/ou l'hypoxie pourraient être considérés comme des facteurs anti-apoptotiques. En effet, différents travaux indiquent que HIF-1 protège les cellules de l'apoptose induite par le manque d'oxygène. L'hypoxie peut également diminuer l'apoptose induite par privation en sérum dans des cellules tumorales. Ceci s'accompagne d'une diminution du ratio Bax/Bcl-2, de l'inhibition de la libération du cytochrome c et d'une réduction de l'activité caspase 3. Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer cela. On sait notamment que l'hypoxie entraîne, de façon indépendante de HIF-1, une augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques comme IAP-2 et le répresseur d'apoptose avec un domaine de recrutement de caspases (ARC, apoptosis repressor with caspase recruitment domain). L'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 augmente en hypoxie et ce de manière dépendante de la voie des p38 MAPK dans les neutrophiles. Le VEGF, un gène cible de HIF-1, semble également avoir un effet anti-apoptotique puisqu'il a été observé que du VEGF exogène protège des cultures primaires de neurones corticaux de la mort induite par l'hypoxie et la privation en glucose. Cette protection est associée à une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN de HIF-1 ainsi qu'à une augmentation de l'expression de ses gènes cibles. La surexpression de HIF-1 α rend des cellules pancréatiques cancéreuses résistantes à l'apoptose induite par l'hypoxie ou par une privation en nutriments. HIF-1 régulerait également l'expression d'un ou plusieurs produits de gènes nécessaires pour la réparation des cassures doubles brins de l'ADN induites par la chimiothérapie ou les radiations. Ainsi, l'hypoxie peut inhiber l'apoptose par plusieurs mécanismes. (Piret et al., 2002b, 2004, 2005 ; Semenza, 2003 ; Schmid et al, 2004)

I.3.2 Hypoxie comme inducteur d'apoptose

Inversement, l'hypoxie sévère ou prolongée induit l'apoptose, au moins partiellement via des voies dépendantes de HIF-1. Il a en effet été observé que l'hypoxie provoque, notamment, une augmentation de l'expression de Bnip3, un facteur pro-apoptotique de la famille Bcl-2 dont le promoteur du gène correspondant contient un HRE. (Piret et al., 2002b; Bruick, 2000)

En hypoxie sévère proche ou équivalente à l'anoxie, une accumulation de p53 est observée. Cette accumulation proviendrait d'une stabilisation de p53 induite par son association avec HIF-1 α . Cette association, qui pourrait, soit être directe, soit faire intervenir Mdm2, a également comme conséquence d'inhiber la transcription dépendante de HIF-1. Il pourrait ainsi y avoir une compétition entre p53 et HIF-1 pour le coactivateur p300. p53 peut alors activer la transcription de différents gènes initiant la mort cellulaire, comme Bax, ou provoquant un arrêt du cycle cellulaire, comme p21. Lorsque la quantité de p53 augmente de

manière importante, il est même capable de cibler HIF-1 α pour l'ubiquitinylation médiée par Mdm2 et la dégradation par le protéasome 26S. Inversement, la perte de p53 semble augmenter la quantité de HIF-1 α induite par l'hypoxie et augmenter l'expression de VEGF dans les cellules tumorales. (Piret et al., 2002b ; Schmid et al, 2004)

Selon sa durée, sa sévérité et le type cellulaire, l'hypoxie peut favoriser ou inhiber l'apoptose. Ces effets semblent notamment impliquer les facteurs de transcription HIF-1 et p53 et, en aval, les protéines de la famille Bcl-2. Il n'est cependant pas exclu que d'autres facteurs puissent également intervenir.

I.4 Objectifs

Le mode d'action de la plupart des thérapies anti-cancéreuses est de provoquer l'apoptose des cellules tumorales. Un des facteurs bien connu pour diminuer l'efficacité de la radiothérapie, de la chimiothérapie et de la thérapie photodynamique, est l'hypoxie tumorale (Brown, 1999 ; Koukourakis et al., 2001). Cependant, les mécanismes par lesquels l'hypoxie agit sont fort peu compris. Il a été montré au laboratoire que l'hypoxie peut protéger, *in vitro*, des cellules de l'apoptose induite de différentes manières. Cet effet passe notamment via la surexpression de Mcl-1 dans certains cas mais pas dans tous (Piret et al., 2005).

Le but de ce travail est d'étudier l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose induite par une molécule utilisée cliniquement en chimiothérapie, l'étoposide, afin de comprendre comment l'hypoxie peut protéger les cellules de la mort par apoptose et de trouver ainsi des pistes d'explication quant à la diminution d'efficacité de ces thérapies *in vivo*. Pour cela, une approche transcriptomique a été utilisée sur une lignée de cellules cancéreuses provenant d'un hépatome humain, les cellules HepG2.

Ce travail se divise en quatre parties. Dans la première, nous avons montré qu'une protection contre l'apoptose induite par l'étoposide existe bien en hypoxie sur les cellules HepG2. Dans la deuxième, l'influence de l'hypoxie sur l'expression de gènes intervenant dans la régulation de l'apoptose a été étudiée en présence d'étoposide. Une troisième partie est consacrée à l'étude de l'activation de différents facteurs de transcription dans ces conditions. Enfin, la dernière partie vise à essayer d'établir des corrélations entre les profils d'induction des gènes, les profils d'activation des facteurs de transcription et les sites de liaison potentiels pour ces facteurs présents dans le promoteur de ces gènes.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail devraient nous permettre d'émettre des hypothèses quant aux gènes et aux facteurs de transcription impliqués dans la résistance des cellules HepG2, en hypoxie, à la mort cellulaire par apoptose induite par l'étoposide.

II. Matériel et méthodes

II.1 Repiquage des cellules

Les cellules utilisées sont des cellules HepG2. Il s'agit d'une lignée cellulaire provenant d'un hépatome humain. Elles sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (T75 ; Costar, Corning, USA) dans du milieu D-MEM (Dulbecco modified Eagle's Medium, 1000 mg/l de glucose; Gibco, UK) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco, UK) et des antibiotiques (Pénicilline (50 U/ml) et Streptomycine (50 µg/ml) ; Bio Whittaker Europe, Belgium). Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37 °C avec 5 % de CO₂. Les cellules sont repiquées un jour sur deux ou sur trois selon le protocole suivant.

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées avec 4 ml de milieu de rinçage (PBS, phosphate buffer saline, Tableau II.1). Afin de détacher les cellules qui adhèrent au fond de la boîte, on y place 2 ml de trypsine-EDTA (Gibco, UK). Après quelques minutes, 5 ml de milieu (DMEM + sérum + antibiotiques) sont rajoutés afin de neutraliser l'action de la trypsine. La suspension cellulaire est alors transvasée dans un tube de 10 ml qui est centrifugé 4 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 4 ml de milieu. Dans une T75, on place 2 ml de cette suspension auxquels on rajoute 13 ml de milieu (ou 18 ml lorsque les cellules ne sont pas repiquées pendant 3 jours). Toutes les solutions utilisées sont préalablement chauffées à 37 °C.

II.2 Incubations

Les incubations ont été réalisées pendant 16 h, à 37 °C en normoxie ou en hypoxie, c'est-à-dire dans une atmosphère normale ou dans une atmosphère contenant 99 % d'azote et 1 % d'oxygène, et ce, avec ou sans étoposide. Pour cela, le milieu de culture est remplacé par 10 ml de milieu CO₂-indépendant (Gibco, UK) contenant de la L-glutamine (36 mg pour 500 ml de milieu ; Sigma, USA) et des antibiotiques (voir point II.1). L'étoposide (Sigma, USA), dilué dans ce milieu, est utilisé à une concentration de 50 µM.

II.3 Evaluation de la fragmentation de l'ADN

II.3.1 Principe

Au cours du processus apoptotique, différentes nucléases sont activées. Celles-ci clivent l'ADN double brin au niveau le plus accessible, c'est-à-dire entre les nucléosomes, engendrant ainsi la formation de fragments de taille multiple de 180 paires de bases, les mono- et oligonucléosomes. En effet, au niveau des nucléosomes, l'ADN est peu accessible car il est fortement empaqueté avec des histones. Le dosage réalisé à partir du kit « cell death detection ELISA » (Roche Molecular Biochemicals, Germany) permet la quantification de ces fragments et donc une évaluation du processus apoptotique.

Pour commencer, des anticorps dirigés contre les histones sont adsorbés sur les parois des puits d'une plaque multipuits. Les sites de liaison aspécifiques sont ensuite saturés par un traitement avec une solution bloquante. Les lysats cellulaires réalisés au préalable sont alors placés dans les puits. Les nucléosomes contenus dans ces lysats se lient via leurs histones aux anticorps anti-histones immobilisés. Enfin, des anticorps anti-ADN-peroxydase reconnaissent l'ADN des nucléosomes. Après le retrait des composés non liés par lavage, la quantité de

peroxydase retenue dans l'immunocomplexe est déterminée de manière colorimétrique avec de l'ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzothiazoline sulfonate]) comme substrat.

II.3.2 Méthode

Les cellules sontensemencées à une densité de 50000 cellules par puits dans une plaque 24 puits (Costar, USA) à raison d'un ml par puits. La concentration cellulaire est déterminée par comptage dans une cellule de Neubauer. Le lendemain, l'incubation est réalisée. Le troisième jour, le milieu présent dans chaque puits est transféré dans un eppendorf qui est centrifugé 3 minutes à 2000 rpm afin de récupérer les corps apoptotiques et les cellules en suspension. Le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans 250 µl « d'incubation buffer » (Roche Molecular Biochemicals, Germany). Cette suspension est replacée dans le puits correspondant. Tout ceci est effectué sur glace. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la solution se trouvant dans chaque puits est transférée dans un eppendorf et centrifugée 7 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est conservé à - 20 °C. La quantité de nucléosomes libres dans le lysat cellulaire est ensuite quantifiée selon le protocole fourni avec le kit (Roche Molecular Biochemicals, Germany).

II.4 Mesure de l'activité des caspases

II.4.1 Principe

Dans la majorité des processus apoptotiques, des caspases sont activées. Elles entraînent la mort cellulaire en clivant différents substrats. La mesure de l'activité de ces protéases permet donc d'évaluer l'apoptose. C'est ce que propose le kit « Homogeneous caspases assay, fluorimetric » (Roche, Germany). Après avoir lysé les cellules cultivées en plaques multipuits, un substrat des caspases, le DEVD-R110 (Asp-Glu-Val-Asp-Rhodamine 110) est ajouté. Si les caspases sont actives, elles vont cliver ce substrat, ce qui permet l'émission de fluorescence par la R110 libérée. L'intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle à l'activité des caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10 permettant ainsi d'évaluer le processus apoptotique.

II.4.2 Méthode

Les cellules sont repiquées et incubées comme décrit en II.3.2. Après l'incubation, les puits sont décantés et 100 µl de substrat stock dilué 10 fois dans du tampon d'incubation est placé dans chaque puits. Les cellules sont alors incubées à 37 °C pour permettre la lyse des cellules et le clivage du substrat par les caspases. La fluorescence de la rhodamine libre est mesurée après 30 minutes et après 1 heure avec un fluorimètre ($\lambda_{\text{excitation}} = 480 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 500 \text{ nm}$). Afin de normaliser les valeurs obtenues par rapport à la quantité de cellules par puits, un dosage protéique par la méthode de Bradford est ensuite réalisé avec 5 µl d'échantillon.

II.5 Dosage protéique par la méthode de Bradford

Cette méthode permet d'estimer la concentration protéique de lysats cellulaires ou nucléaires. 1 ml de solution de Bradford 1 x filtrée (Colorant Bio-Rad Protein Assay 5x ; Bio-Rad, USA) est placée dans des tubes dans lesquels on ajoute 2,5 µl d'étalon (BSA 2 µg/µl ; Bovine Serum Albumin), 2,5 µl d'extraits nucléaires ou 4 µl d'extraits totaux. Des blancs

pour l'étalon (eau) et les échantillons sont également réalisés. Le tube est vortexé et la densité optique est mesurée 5 minutes plus tard au spectrophotomètre (Ultraspec 2100 pro UV/visible) à 595 nm. Chaque mesure est effectuée en double et les deux valeurs sont ensuite moyennées. Entre chaque mesure, la cuvette du spectrophotomètre est rincée à l'acétone et à l'eau. La concentration protéique peut alors être calculée grâce à la formule donnée au Tableau II.2.

II.6 Western Blot

II.6.1 Principe

Cette technique permet la séparation de protéines en fonction de leur poids moléculaire et leur détection de manière semi-quantitative. Pour cela, on réalise d'abord une extraction protéique et un dosage par la méthode de Bradford afin de pouvoir charger la même quantité de matériel dans chaque puits. Ces lysats cellulaires dilués de manière adéquate sont alors placés au sommet d'un gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate). Cette molécule sert à dénaturer les protéines et à leur conférer des charges négatives, permettant ainsi à la migration de n'être influencée que par le poids moléculaire et non pas par la conformation tridimensionnelle ni par les charges des protéines. Du β -mercaptoéthanol est également utilisé afin de rompre les ponts disulfures. La réticulation du gel est choisie en fonction du poids moléculaire des protéines à détecter. Le gel est alors soumis à une différence de potentiel. Après migration, les protéines se trouvant dans le gel sont transférées sur une membrane de polyvinylidène fluorure (PVDF) pour permettre leur accessibilité aux anticorps primaires spécifiques des protéines d'intérêt. Le fragment Fc (fragment constant) de ces anticorps primaires est ensuite reconnu par des anticorps secondaires couplés à la peroxydase. Enfin, une révélation par chimoluminescence est effectuée : la membrane est mise en contact avec le substrat de la peroxydase, le luminol, ainsi qu'avec de l' H_2O_2 . L'oxydation du luminol par la peroxydase HRP (Horse Radish Peroxidase) s'accompagne alors de production de photons qui sont détectés par l'utilisation d'un film autoradiographique (Fig. II.18). Avant la saturation des signaux, l'intensité de ceux-ci est directement proportionnelle à l'abondance de la protéine d'intérêt.

II.6.2 Extraction protéique totale

Pour cette expérience, les cellules sont repiquées dans des boîtes de 25 cm² (T25 ; Costar, Corning, USA). Après incubation, les boîtes sont immédiatement placées sur glace et décantées. Les cellules sont ensuite raclées dans 200 μl de tampon de lyse (Tableau II.3). La suspension cellulaire est placée dans un eppendorf et homogénéisée afin de lyser complètement les cellules. Après 5 minutes de centrifugation à 13000 rpm à 4 °C, le surnageant est stocké à -70 °C. La concentration protéique est ensuite déterminée grâce à la méthode de Bradford.

II.6.3 Electrophorèse Tris-Glycine

Trois spacers enduits de vaseline sont placés entre deux plaques de verre fixées par des pinces. Le gel séparateur (Tableau II.4) est coulé entre ces deux plaques. 1 ml d'isopropanol/isobutanol est alors placé au sommet du gel pour éviter que celui-ci ne se craque, ainsi que pour favoriser sa polymérisation en le préservant de l'oxygène. Après une heure de polymérisation, l'isobutanol est enlevé et le dessus du gel rincé à l'eau distillée. Si le gel concentrateur est coulé le lendemain, une couche d'eau est laissée et le sommet du gel est

couvert d'un parafilm pour la nuit. L'eau est ensuite enlevée et le surplus absorbé à l'aide d'un papier Whatman (Merck, Germany). Le gel concentrateur (Tableau II.4) est coulé jusqu'au bord des plaques et un peigne y est placé pour former les puits. Les échantillons sont alors dilués de manière adéquate dans de l'eau, pour atteindre un volume final de 40 μ l, afin de charger 30 μ g de protéines dans chaque puits. Après avoir ajouté 10 μ l de bleu de charge 5 x (Tableau II.4), des clips sont placés sur les eppendorfs qui sont chauffés 15 minutes à 70 °C afin de dénaturer les protéines. Après une polymérisation d'environ 30 minutes, les pinces et le spacer du bas du gel sont retirés et celui-ci est monté dans la cuve (Gibco BRL). Du running buffer (Tableau II.4) dilué 10 x est placé dans les compartiments supérieur et inférieur et les bulles d'air présentes sous le gel sont éliminées à l'aide d'une seringue. 50 μ l d'échantillon dilué comme décrit ci-dessus sont alors placés dans chaque puits à l'aide de tips longs et fins. 15 μ l d'étalon SeeBlue Plus2 (Invitrogen) sont également chargés dans un puits afin d'obtenir une échelle de poids moléculaire. La cuve est fermée, les adaptateurs placés et une migration (générateur Pharmacia Biotech) est effectuée à 35 mA (70 mA lorsque 2 gels sont branchés simultanément) jusqu'à ce que le front de migration atteigne la séparation entre les 2 gels. A ce moment, la suite de la migration s'effectue à 45 mA (90 mA lorsque 2 gels sont branchés simultanément).

II.6.4 Transfert sur membrane

Une membrane de PVDF (Amersham, UK) est réhydratée pendant 1 minute dans du méthanol 100 %. Ensuite, cette membrane, des papiers Whatman et du cellophane sont équilibrés dans du tampon de transfert (Tableau II.4). Après la migration, le gel est démoulé et le gel concentrateur et les excès de gel sont coupés. Dans l'appareil de transfert (Hoefler SemiPhor), sont placés dans l'ordre, en veillant à éliminer les bulles d'air éventuelles, un plastique percé en son centre, une éponge, deux papiers Whatman, un gel, une membrane de PVDF, deux papiers Whatman et une éponge. Si 2 gels sont superposés, avant l'éponge finale sont placés un papier cellophane, 2 papiers Whatman, un gel, une membrane de PVDF, deux papiers Whatman et enfin l'éponge (Fig. II.19). Le couvercle est alors placé, les fiches branchées, un poids placé sur le montage et le transfert est effectué toute la nuit à 30 mA.

II.6.5 Blocage, incubations avec les anticorps et révélation

Le montage est démoulé et les membranes découpées si cela est nécessaire. Chaque membrane est alors placée dans un biberon avec la face sur laquelle se trouvent les protéines dirigée vers la lumière. Selon la taille du biberon, 20 ou 30 ml de TBS-T-lait (Tableau II.4) sont placés dans ceux-ci afin de saturer les sites de fixation aspécifiques, et ils sont ensuite mis à tourner. Après 1 h de blocage, l'anticorps primaire est dilué (Tableau II.5) dans du TBS-T-lait et placé pendant 1h dans le biberon. La membrane est ensuite lavée 3 x 15 minutes dans du TBS-T (Tableau II.4) puis incubée pendant 45 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP, dilué (Tableau II.6) dans du TBS-T-lait. Après 3 lavages de 15 minutes dans du TBS-T, les membranes sont placées sur une solution faite d'un mélange de solution A et B en quantités égales (kit ECL - Enhanced Chemo Luminescent - Advance Western blotting detection, Amersham, USA). Après 5 minutes, les membranes sont égouttées et placées entre deux transparents dans une cassette. En chambre noire, un film autoradiographique (Amersham, UK) est placé sur la membrane pendant une période pouvant varier de 2 secondes à 15 minutes. Les films sont alors placés dans une solution de révélateur (Ilford 2000 RT, Ilford Imaging, UK) jusqu'à ce que des bandes apparaissent, puis rincés à l'eau et placés dans du fixateur (Ilford 2000 RT, Ilford Imaging, UK) pendant au moins 5 minutes. Enfin, ils sont rincés à l'eau de ville et laissés sécher. Les membranes peuvent

ensuite être congelées, ou bien, si elles doivent être réhybridées, elles sont replacées dans des biberons et rincées deux fois au TBS-T. L'étape de blocage ou bien l'incubation avec l'anticorps primaire peut alors être effectuée overnight. Afin de quantifier les résultats obtenus, la densité optique des bandes est mesurée à l'aide du logiciel « Image Master TotalLab ». Ces valeurs peuvent alors être normalisées par les valeurs obtenues pour une protéine dont l'abondance n'est pas sensée varier dans les conditions étudiées, comme l' α -tubuline par exemple.

II.7 Immunofluorescence

II.7.1 Principe

L'immunofluorescence est une technique qui permet la visualisation, la localisation ainsi que l'estimation qualitative de l'abondance d'une protéine d'intérêt. Pour cela, les cellules sont fixées et perméabilisées. La protéine d'intérêt est alors reconnue par un anticorps spécifique, lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa. Le noyau peut également être marqué à l'aide d'un agent intercalant fluorescent, le To-pro 3. La fluorescence émise par ces fluorochromes lorsqu'ils sont excités par une source laser à une longueur d'onde propre est alors analysée au microscope confocal. Contrairement à l'épifluorescence, la microscopie confocale permet de collecter de l'information à partir d'une section optique de haute définition plutôt qu'à partir de toute la profondeur de l'échantillon. La source lumineuse est un laser Ar/HeNe (Argon Hélium Néon) permettant une excitation à 488 nm, 568 nm et 647 nm.

II.7.2 Méthode

Des couvre-objets de 13 mm de diamètre (Vel, Knitter Glaser, Germany) sont trempés dans de l'alcool et posés sur du papier également stérilisé à l'alcool. Ils sont ensuite placés dans les puits d'une plaque 24 puits (Costar, Corning, USA). Un ml de suspension contenant 50000 cellules est placé dans chaque puits. Le troisième jour, après une nuit d'incubation, les plaques sont immédiatement posées sur glace et les puits décantés. Les cellules sont fixées pendant 10 minutes avec 500 μ l de paraformaldéhyde 4 % (Merck, Germany). Après 3 rinçages de 5 minutes au PBS (Tableau II.1), elles sont perméabilisées au PBS/Triton (Tableau II.7) pour permettre l'accession des protéines d'intérêt aux anticorps. Après 3 rinçages de 5 minutes au PBS/BSA (Tableau II.7), les cellules sont mises en présence de l'anticorps primaire. Pour cela, du papier Whatman humidifié est placé dans une boîte en verre circulaire avec un couvercle adapté. Sur ce papier est placé du parafilm (Pechiney Plastic packaging, USA) sur lequel on pose des gouttes de 30 μ l d'anticorps (Tableau II.8) dilué 100 fois dans du PBS/BSA. Chaque couvre-objet est alors retourné sur une goutte d'anticorps. La boîte est scellée à l'aide de parafilm. Après une incubation de 2 heures, les lamelles sont replacées dans la boîte 24 puits et rincées 3 fois au PBS/BSA. Le même processus est utilisé pour l'incubation, à l'abri de la lumière, avec l'anticorps secondaire (Tableau II.9) dilué 500 fois dans du PBS/BSA. Après 1 heure, les lamelles sont reprises et rincées 3 fois au PBS. Ce processus est utilisé une troisième fois pour le To-pro 3 (Molecular Probe, USA) dilué 80 fois dans de la RNase (2 mg/ml de PBS) et incubé 30 minutes. Les lamelles sont alors reprises, rincées 3 fois au PBS et montées sur lame porte-objet (Superfrost de 2,6 x 7,6 cm ; Vel, Germany) avec du Mowiol (Tableau II.7) préchauffé à 57 °C. Les lames sont ensuite conservées à 4 °C et observées le lendemain au microscope confocal (Leica, Heidelberg, Germany) de manière semi-quantitative en gardant le photomultiplicateur constant.

II.8 Extraction d'ARN total

Pour une bonne isolation d'ARN intact, il faut effectuer une lyse des cellules, travailler en conditions RNases-free, dénaturer les complexes nucléoprotéiques, inactiver les RNases endogènes et éliminer l'ADN et les protéines contaminantes. Pour cela, le système d'isolation d'ARN Total RNAagents® (Promega, USA) a été utilisé.

Après la nuit d'incubation, les T75 sont mises sur glace, les cellules raclées dans 600 µl de tampon de dénaturation, et la suspension cellulaire transférée dans des eppendorfs RNase-free sur glace. 60 µl d'acétate de sodium (2 M, pH 4, Promega, USA) sont ajoutés, puis, après avoir mélangé, on ajoute encore 600 µl de phénol/chloroforme/isoamylalcool (125/24/1 ; pH 4,7 ; Promega, USA). Après 10 minutes d'incubation sur glace, les eppendorfs sont centrifugés 15 minutes à 10000 rpm à 4 °C. La phase aqueuse contenant l'ARN soluble est récupérée et on y ajoute 600 µl d'isopropanol. Après avoir mélangé, les eppendorfs sont placés 30 minutes à -20 °C pour favoriser la précipitation de l'ARN. Ensuite, ils sont centrifugés 10 minutes à 13000 rpm à 4 °C. Après avoir décanté, 1 ml d'éthanol (Merck, Germany) 75 % est ajouté au culot d'ARN et les tubes sont centrifugés 10 minutes à 13000 rpm à 4 °C. Le surnageant est alors décanté et le culot laissé sécher à l'air 10 minutes avant d'être resuspendu dans 25 µl d'eau RNase-free. Cet ARN est alors conservé à -70 °C. Les échantillons sont dosés grâce à un spectrophotomètre après avoir été dilués 50 fois dans de l'eau pour atteindre un volume total de 100 µl. L'absorbance est mesurée à 260 et à 280 nm. Pour un ARN de pureté valable, le ratio $\text{Abs}_{260\text{ nm}} / \text{Abs}_{280\text{ nm}}$ doit être compris entre 1,7 et 2. Afin de vérifier la qualité de cet ARN, il est analysé à l'aide du Bioanalyseur Agilent. Pour cela, il a été dilué à une concentration de 200 ng/µl. Le ratio d'ARN 28S/18S doit être d'approximativement 2 :1. Lorsque l'ARN est dégradé, on obtient un ratio inversé.

II.9 DualChip™ human apoptosis

Il s'agit d'un microdamier à ADN comportant des sondes de détection pour 123 gènes humains (en triplicats) intervenant dans la régulation de l'apoptose (voir liste en Annexe 1). Grâce à cette technique, on peut évaluer la quantité des ARNm des gènes d'intérêt dans les différentes conditions étudiées. L'ARN total est d'abord isolé (voir point II.8), puis, 10 µg sont rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant des d-NTP dont certains sont biotinylés. Cet ADN est ensuite placé sur le microdamier pour une hybridation de 16 h à 60 °C. Les signaux obtenus sont ensuite détectés et quantifiés par un scanner laser confocal puis analysés. Un signal est pris en compte lorsque son intensité moyenne, après soustraction du bruit de fond, est au minimum 2,5 fois plus grande que le bruit de fond local. Les signaux saturés, obtenus pour les gènes fortement exprimés, ne sont pas pris en compte. En plus des 123 gènes, les microdamiers comportent des contrôles positifs et négatifs d'hybridation et de détection. Afin de supprimer les variabilités venant de chacune des étapes, les résultats sont normalisés. Lors de la rétrotranscription, un standard interne est ajouté. Les ADNc produits à partir de ce standard s'hybrident en différents endroits du damier. Ceci permet donc de contrôler la réaction de synthèse de l'ADNc. Une seconde étape de normalisation est basée sur les taux d'expression des HKG (House keeping genes, gènes de maintenance). Le mode opératoire suivi est celui fourni par EAT (Eppendorf Array Technologies, Belgium).

II.10 RT Real-Time PCR

II.10.1 Rétrotranscription (RT)

La transcription inverse permet la production, de manière aspécifique, de l'ADN complémentaire à l'ARN isolé grâce à l'utilisation d'amorces poly-T. L'ADN ainsi obtenu va ensuite pouvoir être amplifié et sa quantité estimée par Real-Time PCR.

2 µg d'ARN sont dilués dans de l'eau RNase-free pour atteindre un volume total de 7,5 µl auxquels on ajoute 2 µl d'oligo (dT)₍₁₂₋₁₈₎ (500 ng/µl ; Invitrogen). Après 10 minutes à 70 °C pour dénaturer les hairpins éventuelles, les tubes sont placés sur glace pendant 5 minutes. 9 µl de mix de réaction (Tableau II.10) sont ensuite rajoutés avant une incubation de 5 minutes à température ambiante. 1,5 µl de SuperscriptTM II RNase H⁻ (200 U/µl ; Invitrogen) sont alors placés et les eppendorfs sont incubés 1h30 à 42 °C pour permettre la rétrotranscription. Afin de dénaturer cette enzyme, une incubation de 15 minutes à 70 °C est effectuée. Ensuite, 1 µl de ribonucléase H (2U/µl ; Invitrogen) est rajouté pour dégrader l'ARN. Après une incubation de 20 minutes à 37 °C, l'ADNc ainsi obtenu est conservé à -20 °C. Entre chaque étape, les eppendorfs sont centrifugés brièvement.

II.10.2 Real-Time PCR

II.10.2.1 Principe

La Real-Time PCR, ou PCR en temps réel, est une technique basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification sélective de séquences d'ADN réalisée grâce à des amorces spécifiques de la séquence à amplifier. L'amplification est effectuée de manière exponentielle à l'aide d'une ADN polymérase thermostable avant de passer par une phase linéaire et une phase plateau. Afin de recueillir des données quantitatives, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification, la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. Pour cela, on effectue la mesure du signal fluorescent émis pendant la synthèse d'ADN suite à l'incorporation du SYBR Green, un fluorochrome s'intercalant de manière non spécifique dans l'ADN double brin (Fig. II.20). L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR car, en solution, le fluorochrome manifeste très peu de fluorescence. Plus il y a de matrices à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond. Ce point est appelé le cycle seuil (Ct, cycle threshold). La valeur de ce Ct, qui apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification, est donc inversement proportionnelle à la quantité initiale d'ADNc cible généré après rétrotranscription, et donc à l'abondance de l'ARNm présent au départ dans l'échantillon (Fig. II.21). Cette valeur servira, après normalisation, à comparer l'abondance d'ARNm d'un gène d'intérêt dans les différentes conditions étudiées. Pour normaliser ces résultats, on utilise la valeur de Ct d'un gène de référence (HKG) dont l'expression est supposée ne pas être influencée par les conditions étudiées, comme l' α -tubuline par exemple. (Poitras and Houde, 2002 ; Bustin, 2000)

II.10.2.2 Méthode

Pour chaque gène étudié (MCL1, BAK, GPX1, p21, JUN), ainsi que pour la tubuline, un mix PCR (Tableau II.11) est préparé et placé dans les puits d'une plaque 96 puits (Applied Biosystems, Holland). Après avoir ajouté 5 µl d'ADNc dilué 100 fois, la plaque est couverte d'un film plastique (Optical Adhesive Covers ; Applied Biosystems, Holland), centrifugée 1 minute à 600 rpm et introduite dans le thermocycler (Applied Biosystems). Après 2 minutes à 50 °C, une dénaturation de 10 minutes est effectuée à 95 °C avant de réaliser 40 cycles composés chacun d'une dénaturation de 15 secondes à 95 °C et de l'hybridation/élongation de 1 minute à 60 °C. La fluorescence est mesurée en permanence au cours de cette amplification.

Afin d'analyser les résultats, les valeurs de Ct doivent d'abord être déterminées. Elles s'obtiennent en fixant le seuil de détection à la moitié de la zone d'amplification exponentielle. En pratique, elles sont déterminées par le logiciel. Des doubles ayant été réalisés, les 2 Ct obtenus sont alors moyennés. On évalue ensuite le ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ du gène d'intérêt – Ct de l'HKG) de chaque gène et pour chaque condition. Chaque condition ayant été étudiée deux fois, les 2 ΔCt sont moyennés. Pour chaque gène d'intérêt, le $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ du gène d'intérêt dans la condition testée – ΔCt du gène d'intérêt dans la condition contrôle) est ensuite calculé. Enfin, le fold d'induction est obtenu par la formule $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Lorsque cette valeur est supérieure à 1, cela veut dire que l'abondance de l'ARNm est plus grande dans la condition test que dans le contrôle et l'inverse lorsqu'elle est inférieure à 1.

II.11 Extraction de protéines nucléaires

Le but d'une telle extraction est d'obtenir un lysat contenant les protéines nucléaires. Pour cela, les T75 sont décantées et les cellules rincées avec 5 ml d'un mélange de PBS (Tableau II.1) froid avec du Na_2MoO_4 (Sigma, USA) 1 mM et de l'NaF (Merck, Allemagne) 5 mM. 10 ml de HB 1 x (Tableau II.12) sont alors placés pendant 3 minutes. Après avoir décanté, les cellules sont raclées dans 500 µl de tampon de lyse 0,2 % NP-40 (Tableau II.12) et transférées dans un eppendorf qui est centrifugé 30 secondes à 13000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 50 µl de RE complet (Tableau II.12). 50 µl de SA complet (Tableau II.12) sont alors ajoutés et les eppendorfs sont mis à tourner sur roue à 4 °C pendant 30 minutes. Enfin, ceux-ci sont centrifugés 5 minutes à 13000 rpm à 4 °C. Le surnageant est conservé à -70 °C et sa concentration protéique déterminée par la méthode de Bradford.

II.12 TFchipMAPK

Il s'agit de microdamiers permettant d'analyser simultanément l'activité de liaison à l'ADN des principaux facteurs de transcription liés aux voies des MAPK (mitogen-activated protein kinase). Chaque damier contient des molécules d'ADN double brin contenant les sites consensus reconnus par les facteurs de transcription étudiés (c-Jun, ATF-2, c-Myc, Elk-1, MEF2, NFATc1, p53, STAT1) en triplicats. Des molécules d'ADN contenant le site consensus muté ainsi que différents contrôles positifs et négatifs sont également présents en triplicats. (Fig. II.22)

Après 1 h d'incubation avec une solution de blocage, les damiers sont rincés. 30 µg d'échantillon sont dilués dans une solution de dilution pour atteindre un volume total de 40 µl, auquel on ajoute 60 µl de tampon de liaison. Ce mélange est placé sur les damiers pendant 1 h à 22 °C et sur un agitateur rotatif à 600 rpm. Les facteurs de transcription activés présents dans ces échantillons se lient à leur séquence consensus et les protéines non liées sont

éliminées par des lavages. Ensuite, une incubation d'1 h avec un cocktail d'anticorps primaires spécifiques chacun d'un facteur de transcription est réalisée. Des lavages sont effectués et les damiers sont ensuite incubés 45 minutes, à l'abri de la lumière, avec une solution d'anticorps secondaires marqués avec la cyanine 3. Après lavages et séchage, les lames sont scannées à différents gains et les images quantifiées (Fig. II.23). Un programme (Silverquant Analysis) est ensuite utilisé pour analyser ces résultats. Les moyennes des valeurs des triplicats pour les spots d'ADN sauvages sont réalisées pour chaque facteur de transcription et on en déduit les moyennes des valeurs obtenues pour les spots d'ADN mutés correspondants. Les signaux correspondants aux facteurs de transcription activés dans chaque échantillon sont normalisés en utilisant les contrôles positifs et négatifs présents sur le damier. Des résultats semi-quantitatifs sont ainsi obtenus. Pour un mode opératoire détaillé, voir le protocole fourni avec la TFChipMAPK (Eppendorf Array Technologies).

II.13 Trans-AM

Il s'agit d'une méthode basée sur le principe de l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Son but est de détecter la liaison d'un facteur de transcription à sa séquence consensus sur l'ADN. Des oligonucléotides doubles brins contenant le site consensus reconnu par ce facteur de transcription sont immobilisés dans des puits d'une plaque 96 puits. Des extraits de protéines nucléaires sont placés dans ces puits, permettant au facteur de transcription d'intérêt de se lier spécifiquement aux oligonucléotides qui s'y trouvent. Des anticorps primaires spécifiques d'un épitope de la forme liée et active de ce facteur de transcription sont ensuite placés. Une incubation subséquente avec un anticorps secondaire anti-IgG conjugué à la peroxydase HRP est alors réalisée. En présence du substrat de l'enzyme, un résultat colorimétrique facilement quantifiable par un spectrophotomètre est obtenu. (Fig. II.24)

Dans les puits d'une plaque 96 puits contenant les oligonucléotides possédant le site consensus pour le facteur de transcription d'intérêt, on place 30 ou 40 µl de tampon de binding complet 1 x (Tableau II.13). On y ajoute 10 ou 20 µl d'extrait nucléaire dilué dans du tampon de lyse à une concentration adéquate (Tableau II.13). Des puits contrôles où sont placés du tampon de lyse seul sont également réalisés. Après 1 h d'incubation sur vortex à température ambiante (2 h pour CREB), les puits sont lavés 3 x avec 200 µl de solution de lavage (Tableau II.13). 100 µl d'anticorps primaire dilué (Tableau II.13) sont alors placés pour 1 h à température ambiante. Après 3 lavages avec la solution de lavage, 100 µl de conjugué dilué (Santa Cruz, USA) est incubé 1 h à température ambiante (Tableau II.13). 4 lavages avec la solution de lavage sont effectués avant de placer 100 µl de TMB (Tetra-Methyl Benzidine, stabilised chromogen; Biosource, Belgium). Après une période d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière pouvant varier de 5 à 30 minutes, 100 µl de solution STOP (contenant de l'H₂SO₄) (Biosource, Belgium) est ajoutée et la densité optique lue à 450 nm (référence 655 nm) grâce à un spectrophotomètre lecteur de plaques multipuits (Ultramark, Microplate Imaging System, Bio-Rad, Germany).

II.14 Systèmes rapporteurs

II.14.1 Principe

Un système rapporteur permet d'évaluer l'activité d'un facteur de transcription dans les conditions étudiées en mesurant l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur dépendant du facteur de transcription d'intérêt.

Le plasmide rapporteur contenant, notamment, le gène rapporteur et son promoteur, est introduit dans les cellules par transfection transitoire. Les ADN plasmidiques utilisés étant des molécules de taille importante chargées négativement, leur entrée dans la cellule n'est pas spontanée. C'est pourquoi nous avons utilisé un agent transfectant, le SuperFect (Quiagen, Germany). Ce dendrimère polycationique, qui possède une architecture sphérique, lie les groupements phosphate de l'ADN lui donnant une structure compacte qui facilite son entrée dans la cellule. De plus, le complexe ainsi formé est chargé positivement, ce qui lui permet d'interagir avec les glycoprotéines de la surface cellulaire qui sont chargées négativement. Cet agent transfectant permet également de stabiliser l'ADN à l'intérieur de la cellule, puisqu'il tamponne le pH de l'endosome, menant ainsi à une inhibition des nucléases de cet endosome. (Fig. II.25)

Le plasmide rapporteur utilisé contient le gène codant pour la luciférase placé sous la dépendance d'un promoteur contenant les séquences consensus reconnues par le facteur de transcription étudié. Lorsque celui-ci est activé, il se fixe à sa séquence consensus et active la transcription du gène codant pour la luciférase. L'activité de la protéine luciférase produite est alors mesurée. En présence d'ATP et de Mg^{+2} , cette enzyme catalyse la formation, à partir de luciférine, de luciféryl-adénylate qui est ensuite oxydé en oxyluciférine en présence d'oxygène. C'est la libération de photons produits au cours de cette réaction que l'on peut mesurer à l'aide d'un luminomètre (Fig. II.26). Le réactif utilisé contient également du coenzyme A afin de fournir un signal luminescent plus stable. Les valeurs obtenues sont proportionnelles à l'activité de la luciférase, elle-même proportionnelle au taux de transcription, qui est lui-même proportionnel à l'activité transactivatrice du facteur de transcription étudié.

L'efficacité de transfection et le nombre de cellules pouvant être variables d'un puits à l'autre, une étape de normalisation est effectuée. Pour cela, un plasmide de normalisation est co-transfecté avec le plasmide rapporteur. On émet l'hypothèse que l'efficacité de transfection est identique pour ces deux plasmides. Sur ce plasmide de normalisation se trouve le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort (CMV, cytomégalovirus). L'expression de la β -galactosidase ne sera donc, normalement, pas influencée par les conditions étudiées. L'absorbance du produit de réaction obtenu après le clivage du substrat par l'enzyme est mesurée après différents temps d'incubation à 37 °C. Les valeurs du dosage de l'activité luciférase sont ensuite normalisées, pour chacun des puits, par celles obtenues pour la mesure de l'activité β -galactosidase.

II.14.2 Méthode

II.14.2.1 Transfection

Les cellules sont repiquées dans des plaques 24 puits à une densité de 50000 cellules par puits. Le lendemain matin, les cellules sont rincées au PBS et 500 μ l de solution de transfection contenant 1,5 μ g d'ADN est placé dans chaque puits. Cette quantité doit contenir 5/13 de plasmide de normalisation (pCMV- β gal) et 8/13 de plasmide rapporteur (tableau II.14). A cette quantité d'ADN, on ajoute du PBS stérile pour obtenir un volume total de 7,5 μ l et, ensuite, 3 μ l de SuperFect (Quiagen, USA). Après 15 minutes pendant lesquels les complexes ADN-SuperFect se forment, 500 μ l de DMEM (sans sérum ni antibiotiques) sont rajoutés. Des triples sont réalisés pour chaque condition. Des cellules sont également incubées avec du DMEM seul pour servir de contrôle de transfection. Environ 7 heures plus tard, cette solution est enlevée et remplacée par du milieu CO₂-indépendant avec ou sans étoposide pour l'incubation de 16 h en normoxie ou en hypoxie.

II.14.2.2 Première méthode de révélation

Le système fourni par le « Bright-GloTM Luciferase Assay » (Promega, USA) a été utilisé. Les puits sont décantés et 200 µl de Glo Lysis Buffer (Promega, USA) est placé dans chaque puits afin de lyser les cellules. Après avoir agité la plaque pendant 5 minutes, 75 µl de substrat β -galactosidase (Tableau II.15) sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits. Après y avoir rajouté 75 µl de lysat, la plaque est incubée à 37 °C. La densité optique est ensuite lue à 450 nm après différents temps d'incubation. Afin de mesurer l'activité luciférase, 75 µl de Bright-Glo sont placés dans une plaque 96 puits blanche auxquels on rajoute le même volume de lysat. Après 5 minutes, la lecture est faite au luminomètre (Luminoscan Ascent, Thermo). Les résultats sont exprimés en valeurs de luminescence divisées par l'activité β -galactosidase du puits correspondant.

II.14.2.3 Seconde méthode de révélation

Les puits sont décantés, 200 µl de tampon de lyse (Passive Lysis Buffer 5x, Promega, USA) dilué 5 fois est placé dans chaque puits, et la plaque est mise à agiter pendant 10 minutes. En ce qui concerne la révélation de l'activité β -galactosidase, la méthode est la même que celle décrite ci-dessus. Pour la révélation de l'activité luciférase, 60 µl de substrat luciférase est placé dans un tube Lumac dans lequel on ajoute 10 µl de lysat. La production de photons, exprimée en RLU (relative light unit), est alors mesurée pendant 10 secondes. (Biocounter, M2010, Lumac). Les résultats sont exprimés en RLU divisés par l'activité β -galactosidase du puits correspondant.

II.15 Recherche *in silico* de sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription dans les promoteurs des gènes d'intérêt

Afin de trouver la séquence des promoteurs des gènes humains étudiés, la base de donnée GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a été consultée. La séquence présente en amont de la séquence codant pour l'ARNm a été sélectionnée.

Afin de retrouver les sites consensus des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B, CREB, STAT1, Elk-1 et c-myc dans les séquences promotrices, le programme en ligne TFSEARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>) a été utilisé. Celui-ci recherche des fragments de séquence hautement corrélés à partir de la base de données allemande TRANSFAC Matrix Table (GBF-Braunschweig) pour établir les profils de sites de liaison de facteurs de transcription (Heinemeyer et al., 1998). Les matrices élaborées pour les facteurs de transcription de vertébrés ont été utilisées avec un seuil de certitude fixé par défaut à 85. Par ailleurs, une recherche manuelle des sites consensus pour HIF-1, NFATc1 et MEF-2 a été effectuée à l'aide du logiciel « DNA strider ». La séquence des sites consensus utilisée pour l'analyse est fournie au Tableau II.16. En ce qui concerne le facteur de transcription p53, le site <http://linkage.rockefeller.edu/p53> a été utilisé et les sites potentiels se trouvant dans les 5000 paires de bases en amont de la séquence codant pour l'ARNm ont été dénombrés (Hoh et al., 2002).

III. Résultats et discussion

Ce travail est divisé en quatre parties. Dans la première, nous avons étudié l'effet de l'hypoxie sur les cellules HepG2 lorsque l'apoptose est induite par l'étoposide. La seconde partie consiste en l'étude de l'expression de gènes en rapport avec l'apoptose, lorsque les cellules sont incubées en présence d'étoposide ou non et ce, en normoxie ou en hypoxie. La troisième partie est consacrée à l'étude de l'activation de plusieurs facteurs de transcription dans les différentes conditions étudiées. Enfin, nous avons tenté d'effectuer des corrélations entre les profils d'expression des gènes, les profils d'activation des facteurs de transcription et la présence de sites consensus potentiels pour ces facteurs de transcription dans le promoteur des gènes étudiés, le but final étant de comprendre comment l'hypoxie influence le processus apoptotique.

III.1 Caractérisation du modèle : l'hypoxie protège les cellules de l'apoptose induite par l'étoposide

L'étoposide, également appelée VP-16, est une molécule utilisée en thérapie anticancéreuse, notamment pour le traitement des cancers des testicules, de certains cancers du poumon et de certains lymphomes (Fig. III.1). Ce dérivé semi-synthétique de la podophyllotoxine provoque la mort par apoptose via l'inhibition de la topoisomérase II. La topoisomérase II est une enzyme nucléaire essentielle pour augmenter l'accessibilité de l'ADN aux machineries de réplication et de transcription. Elle empêche la formation de « nœuds » dans l'ADN en permettant le passage d'un segment intact de l'ADN hélicoïdal par l'intermédiaire d'une cassure double brin transitoire. L'étoposide provoque la stabilisation du complexe ADN-topoisomérase II, entraînant ainsi une cassure double brin non réparable. Ces cassures deviennent des cibles de recombinaison, d'échanges de chromatides sœurs, de production de grandes insertions et délétions ainsi que d'aberrations chromosomiques et de translocations. Quand ces cassures permanentes dans l'ADN sont présentes en concentration suffisante, elles déclenchent une série d'événements menant à la mort cellulaire par apoptose. Parmi ces événements, le principal semble être l'activation de p53, un facteur de transcription généralement activé lors de dommages à l'ADN (voir point I.1.2.4.3). Celui-ci va notamment provoquer l'augmentation de la quantité de Bax et, en conséquence, la libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire vers le cytosol. En plus de p53, d'autres voies semblent activées par l'étoposide. En effet, l'apoptose de cellules ne possédant pas de p53 actif a été décrite suite à un traitement à l'étoposide. (Wang et al., 1999; Hande, 1998; Meresse et al., 2004; Karpnich et al., 2001; Stefanelli et al., 2002; Robertson et al., 2000; Burden & Osheroff, 1998)

Des résultats préliminaires, obtenus au laboratoire, suggéraient que l'hypoxie protège les cellules HepG2 contre l'apoptose induite par l'étoposide (Piret, 2005, thèse de doctorat). Avant d'en étudier les mécanismes, nous avons voulu confirmer cette protection. Nous avons ainsi estimé l'activation des caspases, le clivage de la protéine PARP, et la fragmentation de l'ADN, en présence d'étoposide et ce, en normoxie et en hypoxie. En effet, ces trois événements sont des indicateurs de l'apoptose (voir Introduction).

III.1.1 Etude de l'activation des caspases

Un des événements les plus caractéristiques de nombreux processus apoptotiques est l'activation des caspases, parmi lesquelles la caspase 3 semble être la plus importante. Afin d'étudier l'activation de ces protéases, deux approches expérimentales ont été utilisées : l'évaluation du clivage d'un substrat des caspases, et l'immunofluorescence. Ces expériences sont effectuées après une incubation de 16 h dans quatre conditions : en normoxie avec (Ne) ou sans (N) étoposide ainsi qu'en hypoxie avec (He) ou sans (H) étoposide, l'étoposide étant utilisé à une concentration de 50 μ M.

III.1.1.1 Mesure de l'activité des caspases

La fluorescence de la rhodamine 110, libérée après le clivage d'un substrat DEVD-R110 par les caspases, est mesurée dans les quatre conditions étudiées.

Les résultats obtenus, présentés graphiquement à la figure III.2, révèlent des activités de caspases comparables en normoxie et en hypoxie. Dans les deux concentrations en oxygène, une augmentation de leur activité est détectée lors de l'ajout d'étoposide. Cette activité est néanmoins bien inférieure en hypoxie qu'en normoxie.

III.1.1.2 Etude de l'activation de la caspase 3 par immunofluorescence

Une immunofluorescence révélant la forme active de la caspase 3 par un marquage vert a été réalisée dans les différentes conditions utilisées (Fig. III.3).

En normoxie et en hypoxie, on observe un nombre très faible de cellules marquées. En ce qui concerne les cellules incubées en présence d'étoposide, ce nombre est fortement augmenté en normoxie alors qu'il ne l'est pas en hypoxie.

III.1.1.3 Conclusion

Dans ces deux expériences, on observe une activation importante des caspases lorsque les cellules sont incubées en présence d'étoposide en normoxie mais beaucoup moins en hypoxie, alors que les niveaux d'activation en absence d'étoposide sont similaires pour les deux tensions en oxygène étudiées. Il semble donc que l'hypoxie ait un effet protecteur contre l'apoptose induite par l'étoposide sur les cellules HepG2.

III.1.2 Etude du clivage de la protéine PARP par Western Blot

La protéine PARP est une enzyme qui effectue des réparations dans l'ADN en utilisant de l'énergie. Lors d'un processus apoptotique, elle est clivée par des caspases, permettant ainsi de préserver le pool d'ATP nécessaire à l'accomplissement de l'apoptose et d'empêcher les processus de réparation qui sont inutiles pour une cellule destinée à mourir. Ce clivage de PARP dans les différentes conditions étudiées peut être détecté par Western Blot en suivant la présence d'un fragment de 85 kDa en plus de la bande correspondant à la protéine entière (116 kDa).

L'abondance du fragment clivé est très faible en absence d'étoposide, et même non quantifiable en hypoxie. Dans les deux cas, l'étoposide augmente le clivage de PARP, mais ce clivage est beaucoup plus important en normoxie qu'en hypoxie. (Fig. III.4)

Le clivage de PARP étant un événement spécifiquement observé lors de l'apoptose, on peut conclure de cette expérience que l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules HepG2 est plus importante en normoxie qu'en hypoxie. Etant donné que le clivage de PARP dépend des caspases et que l'activité de celles-ci est plus grande en normoxie étoposide qu'en hypoxie étoposide (voir point III.1.2), il s'agit d'un résultat attendu.

III.1.3 Evaluation de la fragmentation de l'ADN

Lors de l'apoptose, différentes nucléases sont activées. Celles-ci vont cliver l'ADN en générant des mono- et oligonucléosomes qui peuvent être quantifiés à l'aide d'un test de type ELISA.

Les résultats obtenus sont présentés graphiquement à la figure III.5. La fragmentation de l'ADN est à un taux basal comparable en normoxie et en hypoxie. Lors de l'ajout d'étoposide, cette fragmentation est fortement augmentée. Cependant, l'augmentation est moindre en hypoxie qu'en normoxie.

Ces résultats montrent donc une protection des cellules HepG2 contre l'apoptose induite par l'étoposide lorsqu'elles sont incubées en hypoxie.

III.1.4 Conclusion

Les résultats obtenus pour les quatre expériences décrites ci-dessus vont tous dans le même sens. L'hypoxie ne semble pas augmenter l'apoptose dans les cellules HepG2 alors que l'étoposide le fait de manière importante. Par contre, la combinaison des conditions hypoxiques et de l'étoposide permet une diminution de l'apoptose par rapport aux cellules incubées dans les mêmes conditions mais en normoxie. L'hypoxie a donc un effet protecteur contre l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules HepG2. Il est à noter que des observations similaires ont déjà été obtenues, notamment lorsque ces cellules sont incubées en présence de tert-butyl hydroperoxyde, un agent oxydant (Piret et al., 2004). L'hypoxie pourrait donc protéger les cellules de l'apoptose induite par différents stimuli.

III.2 Etude de l'expression de gènes

Dans cette deuxième partie nous nous sommes intéressés à l'impact de l'hypoxie et de l'étoposide, en normoxie et en hypoxie, sur l'expression de gènes dont le produit intervient dans la régulation de l'apoptose. Pour cela, nous avons utilisé la « DualChipTM human apoptosis » et quelques-uns des résultats ainsi obtenus ont été confirmés par Real-Time PCR. L'abondance de certaines des protéines correspondantes a ensuite été estimée par Western Blot afin de vérifier si l'abondance protéique varie de manière parallèle avec l'abondance de l'ARNm.

III.2.1 Etude de l'abondance des ARNm

III.2.1.1 Au moyen de la « DualChipTM human apoptosis »

Il s'agit de microdamiers permettant la détection de la quantité de 123 ARNm correspondant à 123 gènes intervenant dans la régulation de l'apoptose (voir liste en Annexe 1). Les cellules sont incubées 16 h dans du milieu CO₂ – indépendant contenant ou non de l'étoposide à une concentration de 50 µM, et ce en normoxie ou en hypoxie. Après cette incubation, l'ARN total est isolé et sa qualité est évaluée grâce à l'Agilent (Fig. III.6). 10 µg de cet ARN est alors rétrotranscrit en ADNc en utilisant des dNTP dont certains sont biotinylés. Cet ADNc est ensuite hybridé sur les microdamiers et, enfin, les signaux sont détectés, quantifiés et analysés. Des triples d'échantillons ont été réalisés avec 3 réplicats pour chacun d'entre-eux.

Pour chaque gène, le degré d'induction par rapport à la normoxie a été calculé pour les conditions normoxie étoposide, hypoxie et hypoxie étoposide. Les moyennes et écart-types ont été calculés après avoir supprimé les valeurs « non détectées » et les valeurs aberrantes. Les moyennes dont la valeur est plus grande que 1 plus un écart-type ou plus petite que 1 moins un écart-type ont été sélectionnées ; on dira de ces gènes que leur expression est augmentée ou diminuée. Les gènes dont l'expression n'est ni augmentée ni diminuée, pour aucune des trois conditions, n'ont pas été considérés dans l'analyse. On obtient ainsi 65 gènes que l'on peut classer en fonction de leur profil d'induction (Tableau III.1).

La première constatation que l'on peut faire est que l'étoposide provoque surtout une augmentation de l'expression d'une série de gènes ; peu de sous-expressions sont détectées. Même si l'étoposide provoque la mort cellulaire, une activité transcriptionnelle importante semble donc exister. Un des effets les mieux connus de l'étoposide est d'activer le facteur de transcription p53 ainsi que la transcription des gènes cibles de ce facteur (Sun, 2000 ; Wang et al., 1999). Dans les résultats obtenus ici, on retrouve en effet une augmentation de la quantité d'ARNm de nombreux gènes connus pour être des gènes cibles de p53 ; citons notamment CDKN1A, MDM2, GPX-1, BAX et GADD45A. On observe également une induction importante des gènes codant pour l'inhibiteur d'apoptose BIRC3, la kinase CLK-1, une protéine liant l'IGF, IGFBP4, ainsi qu'un membre de la famille des récepteurs au TNF, TNFRSF6 (Fas).

D'autre part, l'hypoxie engendre plutôt une diminution de l'expression de nombreux gènes. En effet, afin de préserver l'ATP, les cellules exposées à des conditions d'hypoxie inhibent de manière générale leurs synthèses d'ARN et de protéines (Michiels, 2004). Par contre, certains gènes sont induits de manière spécifique en hypoxie. Parmi ceux-ci, on retrouve plusieurs gènes connus pour être des gènes cibles du facteur de transcription HIF-1 comme MCL-1, l'aldolase (ALDOA) et BNIP3 (Piret et al., 2005 ; Semenza, 2003 ; Bruick,

2000). Une augmentation de l'expression d'autres gènes est également observée, notamment pour JUN, CLK-1 et MAP2K1.

Le fait de retrouver, dans nos résultats expérimentaux, une augmentation de l'expression de gènes cibles de p53 en présence d'étoposide et de gènes cibles de HIF-1 en hypoxie montre que les résultats obtenus à l'aide de la « DualChip™ human apoptosis » sont valides.

En ce qui concerne l'influence combinée de l'hypoxie et de l'étoposide, on retrouve souvent un effet similaire à celui observé en condition d'hypoxie seule. L'effet de l'hypoxie serait donc dominant sur celui de l'étoposide. C'est notamment le cas pour les inductions observées dans le Tableau III.1A et les diminutions d'expression décrites au Tableau III.1B. Certaines différences sont cependant observées. Premièrement, on retrouve, en condition d'hypoxie en présence d'étoposide, la surexpression de 4 gènes induits par l'étoposide seul, sur lesquels l'hypoxie n'a donc pas d'effet. Il s'agit de BAX, IGFBP2, MDM2 et TNFRSF6. Deuxièmement, les premiers gènes décrits dans le Tableau III.1C voient leur expression diminuer en hypoxie et être induite fortement par l'étoposide tandis que l'hypoxie diminue cette augmentation de l'expression induite par l'étoposide sans toutefois l'inhiber complètement. On observe donc pour ces 5 gènes un profil d'expression qui varie en parallèle avec le degré d'apoptose observé dans les expériences précédentes. Trois d'entre eux seront étudiés plus en détails dans la suite de ce travail. Il s'agit de BAK1, CDKN1A et GPX1. AKT2 et E2F5 ont également un profil d'expression qui varie de condition à condition et mériteraient d'être étudiés de manière plus approfondie.

Puisqu'on observe une protection contre l'apoptose en hypoxie étoposide, on peut espérer observer une induction plus importante de gènes anti-apoptotiques et/ou une répression de l'expression de gènes pro-apoptotiques dans cette condition. Parmi les gènes pour lesquels le niveau d'induction est le plus différent entre les conditions normoxie étoposide et hypoxie étoposide, on retrouve en effet, en hypoxie étoposide, l'induction du gène anti-apoptotique MCL-1 et une diminution de l'expression des gènes pro-apoptotiques BAX, CASP1, BIK et BAK1. Cependant, on observe également une induction du gène pro-apoptotique BNIP3 et une répression du gène anti-apoptotique BCL-X.

En conclusion, l'analyse des résultats obtenus à l'aide de la « DualChip™ human apoptosis » a permis de montrer que l'hypoxie et l'étoposide engendraient des variations d'expression de gènes différentes. De plus, l'hypoxie influence de manière considérable les changements d'expression induits par l'étoposide.

III.2.1.2 Par Real-Time PCR

Afin de confirmer les résultats obtenus grâce à la « DualChip™ human apoptosis », une Real-Time PCR a été effectuée. Après avoir incubé les cellules 16 h en normoxie ou en hypoxie en présence ou non d'étoposide à une concentration de 50 μ M, l'ARN total est isolé. Avant de le rétrotranscrire en ADNc, cet ARN est passé à l'Agilent afin d'en vérifier sa qualité (Fig. III.6). Après rétrotranscription, l'ADNc obtenu subit une amplification qui est suivie au cours du temps ; il s'agit de la PCR en temps réel. Le suivi de l'abondance de l'ADN produit est réalisé en effectuant la mesure du signal fluorescent émis par le SYBR Green. Il s'agit d'une molécule placée dans le mix PCR qui possède une activité de fluorescence lorsqu'elle s'intercale de manière non spécifique dans l'ADN double brin. Cette PCR en temps réel a été effectuée pour 5 gènes d'intérêt (MCL1, BAK1, GPX1, CDKN1A et JUN) ainsi que pour l' α -tubuline afin de pouvoir normaliser les résultats obtenus, et ce sur 2

des 3 échantillons utilisés pour la chip. Le Tableau III.2 présente la comparaison des résultats obtenus par ces deux techniques.

Les résultats obtenus en Real-Time PCR confirment de manière générale les augmentations et diminutions d'expression de gènes obtenues grâce à la DualChip. Les niveaux d'induction quantifiés par Real-Time PCR sont parfois plus élevés que ceux obtenus par l'analyse en microdamier, probablement parce que le *dynamic range* de la Real-Time PCR est plus grand que celui du microdamier. Une autre hypothèse d'explication serait que la différence obtenue proviendrait de la différence du ou des *house keeping gene(s)* utilisés dans ces deux approches.

III.2.2 Etude de l'abondance de protéines par Western Blot

Afin de déterminer si l'abondance protéique varie de la même manière que l'abondance des ARNm, des Western-Blot ont été effectués pour différentes protéines. Pour ce faire, des cellules HepG2 ont été incubées 16 h dans du milieu CO₂ – indépendant contenant ou non de l'étoposide à une concentration de 50 µM, et ce en normoxie ou en hypoxie. Une extraction protéique totale est alors réalisée et la concentration protéique mesurée. Ces protéines sont ensuite séparées en fonction de leur poids moléculaire sur un gel de polyacrylamide. Après transfert des protéines contenues dans le gel sur une membrane de PVDF, la protéine d'intérêt est reconnue par un anticorps primaire qui lui est spécifique. Celui-ci est à son tour reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Enfin, une révélation par chémoluminescence est effectuée. Avant la saturation des signaux, l'intensité de ceux-ci est directement proportionnelle à l'abondance de la protéine. Cette technique a été réalisée pour 6 protéines d'intérêt afin de déterminer leur abondance relative dans les différentes conditions étudiées, ainsi que pour l' α -tubuline pour la normalisation (Fig. III.7).

L'abondance de la protéine p53 est augmentée par une incubation avec l'étoposide. L'hypoxie a pour effet de diminuer sa quantité. En hypoxie étoposide, la valeur obtenue est intermédiaire, proche de la valeur de la normoxie.

En normoxie, la présence d'étoposide entraîne une augmentation de la quantité de p21 (protéine encodée par le gène CDKN1A) de près de 10 fois. Aucune bande n'a été détectée en hypoxie en absence d'étoposide alors que, en présence de cette molécule, une valeur proche de celle obtenue en normoxie est observée.

La présence de la protéine Mdm2 n'est détectée qu'en normoxie et l'étoposide diminue son abondance de moitié.

La protéine Bak1 est plus abondante en normoxie étoposide et en hypoxie sans étoposide qu'en normoxie. Par contre, en hypoxie étoposide, une valeur comparable à celle obtenue en normoxie est obtenue.

En normoxie, l'ajout d'étoposide provoque un triplement de la quantité de c-jun, comme notamment décrit par Perez et al. (1994) sur des promonocytes. L'hypoxie entraîne également une augmentation de la quantité de cette protéine, ce qui avait déjà été décrit par Minet et al. (2001). Les résultats obtenus en hypoxie étoposide sont similaires à ceux obtenus en hypoxie en absence d'étoposide.

Comme c-jun est un facteur de transcription qui peut s'hétérodimériser avec c-fos, l'abondance de cette protéine a également été étudiée. L'hypoxie et l'étoposide diminuent légèrement son abondance.

III.2.3 Conclusion

L'utilisation de la « DualChip™ human apoptosis » nous a permis de confirmer l'induction de nombreux gènes cibles de p53 lors de l'ajout d'étoposide ainsi que la surexpression de gènes cibles de HIF-1 en hypoxie. De plus, les résultats obtenus en hypoxie étoposide semblent plus proches de ceux obtenus en hypoxie que de ceux obtenus en normoxie étoposide. Le profil d'expression de BAK1, CDKN1A, GPX1, CDC2 et PCNA, dans ces conditions, est cependant différent de celui observé en hypoxie ou en présence d'étoposide. Leur variation du niveau d'expression semble être parallèle au degré d'apoptose obtenu dans les différentes conditions expérimentales. Un lien de cause à effet reste cependant à être démontré.

Les résultats obtenus à l'aide de la DualChip ont été confirmés, au niveau de l'ARNm par des mesures réalisées en Real-Time PCR. Par ailleurs, pour ce qui est du niveau d'expression protéique, plusieurs observations sont à noter. L'abondance protéique varie de manière assez semblable à la quantité d'ARNm pour p53 et CDKN1A/p21. La tendance observée concernant c-jun est comparable à part que, en normoxie étoposide, l'augmentation de la quantité protéique a une amplitude plus importante que l'augmentation de la quantité d'ARNm, ce qui pourrait être expliqué par une stabilité accrue de l'ARNm. Par contre, les résultats obtenus aux niveaux protéique et de l'ARNm sont fort différents en ce qui concerne Mdm2 et Bak1. En effet, la protéine Mdm2 n'est pas détectée en hypoxie et l'étoposide a un effet inhibiteur en normoxie alors qu'au niveau de l'ARNm, une augmentation est détectée et en présence d'étoposide et en condition d'hypoxie. Arriola et al. (1999) observent, qu'aux concentrations cytotoxiques, l'étoposide inhibe l'induction de Mdm2 au niveau de l'ARN mais également au niveau protéique, ce qui est contraire à nos résultats. L'étoposide a pour effet d'augmenter les quantités protéique et d'ARNm de Bak1. Cependant, l'hypoxie provoque une diminution de la quantité d'ARNm alors que la quantité de protéine est augmentée. Il semble donc que des régulations importantes peuvent exister après la transcription afin de réguler le niveau d'expression protéique. Pradet-Balade et al. (2001) ont en effet montré qu'il existait peu de corrélation entre les abondances de différents ARNm et celles des protéines correspondantes. Une étude approfondie de l'expression des autres gènes d'intérêt au niveau protéique sera donc nécessaire à la suite de ce travail.

III.3 Etude de l'activation de facteurs de transcription

Les agents anti-tumoraux et l'hypoxie sont décrits pour modifier l'activité de différents facteurs de transcription (Brantley-Finley et al., 2003 ; Faller, 1999 ; Guillemain & Krasnow, 1997). Afin d'essayer de corrélérer les profils d'induction des gènes décrits au point III.2 avec l'activation de facteurs de transcription, nous nous sommes intéressés à quelques-uns de ceux-ci. Pour cela, différentes approches ont été utilisées. La liaison à l'ADN de facteurs de transcription activés a été déterminée grâce à la TFChipMAPK et par Trans-AM. Leur abondance et leur localisation ont ensuite été évaluées par immunofluorescence, et l'utilisation de systèmes rapporteurs nous a enfin permis d'estimer l'activité transcriptionnelle de certains d'entre-eux.

III.3.1 Etude de l'activité de liaison à l'ADN de facteurs de transcription grâce à la TFChipMAPK

Cette chip est constituée de microdamiers permettant la détection simultanée de l'activité de liaison à l'ADN de 8 facteurs de transcription (p53, AP-1 (c-jun), Elk-1, ATF-2, MEF-2, c-myc, STAT-1 et NFATc1). Chaque damier contient, en plus d'une série de contrôles, des molécules d'ADN double brin contenant les sites consensus reconnus par ces facteurs de transcription. Les cellules sont incubées 16 h en normoxie ou en hypoxie en présence ou non d'étoposide à une concentration de 50 μ M. Les protéines nucléaires qui sont alors extraites sont hybridées sur les damiers et les facteurs de transcription d'intérêt activés se lient à leur séquence consensus. Ces facteurs sont alors détectés par des anticorps primaires spécifiques, eux-mêmes reconnus par des anticorps secondaires couplés à la cyanine 3. Les signaux de fluorescence obtenus sont détectés à différents gains, quantifiés et analysés. Pour chaque condition, quatre expériences indépendantes ont été réalisées et ces échantillons ont été hybridés de manière indépendante. Un exemple d'image obtenue pour chaque condition, après avoir scanné le microdamier, est présenté à titre illustratif à la figure III.8. Après quantifications, normalisations et calculs de moyennes, un histogramme reprenant les résultats obtenus a pu être tracé pour chaque facteur de transcription (Fig. III.9).

Par rapport à sa liaison à l'ADN en normoxie, la liaison de p53 est augmentée lorsqu'on ajoute de l'étoposide, elle est par contre réduite en hypoxie. La combinaison des conditions hypoxie et étoposide donne une valeur légèrement plus élevée que celle observée en normoxie mais inférieure à celle obtenue en présence d'étoposide seul.

La liaison de c-jun à sa séquence consensus ne semble pas être affectée de manière significative par la présence d'étoposide en normoxie. En hypoxie, une légère augmentation du signal est obtenue ; celle-ci est accentuée lors de l'ajout d'étoposide.

En ce qui concerne Elk-1, sa liaison à l'ADN est comparable en normoxie en présence ou non d'étoposide. Par contre, elle diminue en hypoxie mais augmente jusqu'à une valeur proche de celle obtenue en normoxie pour la condition hypoxie étoposide.

En normoxie, l'étoposide a pour effet de diminuer la liaison d'ATF-2 à sa séquence consensus. L'hypoxie n'influence pas sa liaison à l'ADN, que ce soit en présence ou non d'étoposide.

L'ajout d'étoposide ne semble pas affecter beaucoup la liaison à l'ADN de MEF-2. Par contre, l'hypoxie a pour effet de diminuer cette liaison, en présence et en absence d'étoposide.

La liaison de c-myc à sa séquence consensus n'est pas détectée en présence d'étoposide. En absence de cette molécule, un signal très faible et non significatif est obtenu.

En ce qui concerne la liaison à l'ADN de STAT-1, des valeurs non significatives, car trop faibles, sont obtenues.

La présence de NFATc1 sur sa séquence consensus n'a été détectée dans aucune des conditions étudiées.

On observe donc que l'étoposide et l'hypoxie peuvent avoir des effets importants et variés sur l'activité de liaison à l'ADN de différents facteurs de transcription.

III.3.2 Etude de l'activité de liaison à l'ADN de facteurs de transcription par Trans-AM

Afin de confirmer les résultats obtenus grâce à la TFChipMAPK et d'obtenir des données pour des facteurs de transcription non détectables à l'aide de cet outil, des dosages Trans-AM ont été effectués. Après avoir incubé les HepG2 16 h en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non d'étoposide à une concentration de 50 μ M, les protéines nucléaires sont extraites et placées dans des puits contenant des molécules d'ADN double brin possédant le site consensus reconnu par le facteur de transcription d'intérêt. Les facteurs liés à ces oligonucléotides sont détectés par un anticorps primaire, lui-même reconnu par un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase HRP. Lors de l'ajout du substrat de l'enzyme, un résultat colorimétrique permet d'estimer la liaison à l'ADN du facteur de transcription d'intérêt. Les résultats obtenus pour les 6 facteurs étudiés sont présentés à la figure III.10.

La liaison de p53 à l'ADN est fortement augmentée en présence d'étoposide et fortement diminuée en hypoxie. La conjonction de ces deux conditions donne un résultat légèrement plus élevé que celui obtenu en hypoxie. Ces résultats sont fort similaires à ceux obtenus à l'aide de la TFChipMAPK.

L'hypoxie provoque une diminution importante de la liaison à l'ADN de Elk-1. Pour les deux tensions en oxygène étudiées, la présence d'étoposide entraîne une légère augmentation de liaison. Ces résultats confirment tout à fait ceux obtenus sur la TFChipMAPK.

Les résultats obtenus pour la liaison à l'ADN des protéines c-fos et c-jun du facteur de transcription AP-1 sont fort différents. L'étoposide et l'hypoxie diminuent légèrement la liaison à l'ADN de c-jun. Par contre, la combinaison de ces 2 conditions l'augmente fortement, comme nous l'avions déjà observé sur la TFChipMAPK. Quant à la protéine c-fos, sa liaison à sa séquence consensus est augmentée en hypoxie et de manière encore plus forte en normoxie étoposide. La valeur d'absorbance obtenue en hypoxie étoposide est similaire à celle de la condition normoxie étoposide.

Aucun effet de l'étoposide et/ou de l'hypoxie n'est observé pour la sous-unité p50 du facteur de transcription NF- κ B, ni pour CREB.

On observe donc à nouveau des effets importants et variés de l'étoposide et de l'hypoxie sur la liaison de différents facteurs de transcription à leur séquence consensus. De plus, les résultats obtenus pour un même facteur à l'aide de la TFChipMAPK et dans les dosages Trans-AM sont cohérents.

III.3.3 Etude de l'abondance et de la localisation de facteurs de transcription par immunofluorescence

Après avoir été incubées 16 h en normoxie ou en hypoxie en présence ou non d'étoposide à une concentration de 50 μ M, les cellules adhérant à des couvre-objets sont fixées et perméabilisées. Un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt est mis en contact avec les cellules. Il est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa 488 nm. Le noyau est marqué au To-Pro 3. La fluorescence émise par ces fluorochromes lorsqu'ils sont excités par une source laser est alors analysée au microscope confocal. Les noyaux sont visibles en bleu et les protéines d'intérêt apparaissent en vert sur les photographies. Les images obtenues nous permettent d'estimer l'abondance et la localisation de différents facteurs de transcription. En effet, pour qu'un facteur puisse être effectivement actif *in vivo*, il doit se localiser dans le noyau. Par ailleurs, certains nécessitent une phosphorylation détectable à l'aide d'anticorps dirigés contre la forme phosphorylée.

Pour la protéine c-jun, on observe un marquage hétérogène dans chaque condition, c'est-à-dire que certaines cellules sont fort marquées alors que d'autres le sont très peu. L'hypoxie semble augmenter légèrement l'abondance de la protéine. L'étoposide a un effet positif encore plus important, quelle que soit la tension en oxygène. Dans tous les cas, la protéine semble localisée principalement dans le noyau (Fig. III.11). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en Western Blot, à part qu'on n'y détectait pas d'effet de l'étoposide en hypoxie.

Lors de l'étude de la protéine c-fos, un marquage cytoplasmique et nucléaire est visible en normoxie, en présence ou non d'étoposide, ainsi qu'en hypoxie étoposide. Ce marquage est beaucoup plus faible en hypoxie en absence d'étoposide. (Fig. III.12) Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Western Blot où on observait que l'hypoxie et l'étoposide diminuaient légèrement l'abondance de la protéine c-fos.

La protéine Elk-1 phosphorylée possède une localisation principalement nucléaire dans les quatre conditions étudiées mais aucune différence importante n'est observée quant à l'abondance de la protéine phosphorylée dans ces conditions. (Fig. III.13)

En ce qui concerne la protéine ATF-2 phosphorylée, un marquage hétérogène mais principalement nucléaire est observé dans toutes les conditions. Il semble que ce soit en hypoxie étoposide que l'abondance soit la plus importante. (Fig. III.14)

Un marquage cytoplasmique et nucléaire de CREB phosphorylé plus important est observé en normoxie qu'en hypoxie. La présence d'étoposide ne semble pas avoir d'influence sur l'abondance ou la localisation de cette protéine, quelle que soit la tension en oxygène (Fig. III.15).

Le marquage de la protéine STAT-1 α est plus important en hypoxie qu'en normoxie mais la protéine est principalement localisée dans le cytoplasme dans les deux conditions. En normoxie, l'étoposide ne semble pas avoir d'effet sur l'abondance et la localisation de la protéine. En hypoxie étoposide, STAT-1 α semble plus abondant et migre dans le noyau (Fig. III.16).

La protéine p65 du facteur de transcription NF- κ B est présente dans le cytoplasme des cellules en normoxie. Son abondance semble augmenter en hypoxie et une légère translocation nucléaire est observée dans quelques cellules. Par contre, l'étoposide ne semble pas avoir d'effet, quelle que soit la tension en oxygène. (Fig. III.17)

On ne détecte pas de protéine HIF-1 α en normoxie, que ce soit en absence ou en présence d'étoposide. Par contre, en hypoxie, avec ou sans étoposide, un net marquage nucléaire est observé. (Fig. III.18)

Selon la protéine étudiée, l'hypoxie et l'étoposide peuvent donc avoir des effets divers sur l'abondance et la localisation des facteurs étudiés, comme ils en avaient sur l'activité de liaison à l'ADN de ces facteurs.

III.3.4 Etude de l'activité de facteurs de transcription par système rapporteur

Afin de vérifier que l'augmentation de la liaison à l'ADN des facteurs de transcription étudiés (voir points III.3.1 et III.3.2) mène à une transcription effective, des systèmes rapporteurs ont été utilisés. Les cellules ont été transfectées avec deux plasmides : un premier contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle d'un promoteur artificiel contenant plusieurs fois la séquence consensus reconnue par le facteur de transcription étudié, et un second, servant à la normalisation, contenant le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Après la transfection, les cellules sont incubées 16 h dans du milieu CO₂ – indépendant contenant ou non de l'étoposide à une concentration de 50 μ M, et ce en normoxie ou en hypoxie. Les activités β -galactosidase et luciférase sont alors mesurées en colorimétrie et en luminescence, respectivement. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogramme à la figure III.19.

La transcription dépendante de p53 est augmentée lors de l'ajout d'étoposide en normoxie. L'hypoxie provoque une diminution de moitié de l'activité transcriptionnelle par rapport à celle obtenue en normoxie. En hypoxie étoposide, la valeur est proche de celle observée en normoxie. Ces résultats sont tout à fait en concordance avec ceux obtenus lorsque la liaison à l'ADN de p53 est mesurée.

Pour le facteur de transcription AP-1, les valeurs en normoxie, en présence ou non d'étoposide, sont similaires. L'hypoxie provoque une grande augmentation de l'activité transcriptionnelle du facteur : de 7 fois en absence d'étoposide et de 13 fois en présence de cette molécule. Il s'agit d'un profil d'activation identique à celui obtenu pour la liaison à l'ADN de c-jun lorsqu'elle est mesurée à l'aide de la TFChipMAPK.

Les facteurs de transcription CREB et ATF-2 peuvent tous deux se lier aux sites consensus CRE. Les valeurs obtenues en normoxie, normoxie étoposide et hypoxie étoposide, dans le système rapporteur dépendant de cette séquence d'ADN, sont assez similaires. Par contre, en hypoxie sans étoposide, une induction de plus de trois fois est observée. Ce profil d'activité avec induction en condition d'hypoxie correspond plus à celui obtenu pour ATF-2 qu'à celui obtenu pour CREB lorsque la liaison à l'ADN est mesurée. Ce serait donc plutôt ATF-2 qui serait activé dans ces conditions.

L'ajout d'étoposide en normoxie provoque un doublement de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription NF- κ B. L'hypoxie ne semble pas avoir d'influence importante. Par contre, les valeurs obtenues en hypoxie étoposide sont presque trois fois supérieures à celles observées en normoxie. L'étoposide augmente donc l'activité de NF- κ B. Il n'y a cependant pas de corrélation entre ces résultats et ceux obtenus avec le Trans-AM ou en immunofluorescence.

En hypoxie, l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription HIF-1 est environ trois fois plus élevée qu'en normoxie. L'étoposide ne semble pas avoir d'effet sur cette activité. Ce résultat est en corrélation avec les observations effectuées en immunofluorescence.

III.3.5 Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus concernant la liaison à l'ADN, la localisation, l'abondance nucléaire et l'activité transcriptionnelle des différents facteurs de transcription étudiés sont synthétisés au Tableau III.3. Différentes conclusions peuvent être tirées à partir de ces données.

En ce qui concerne p53, une tendance identique est observée pour les résultats concernant l'activité de liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle, c'est-à-dire une augmentation d'activité lors de l'ajout d'étoposide et une diminution en hypoxie. La valeur obtenue pour les cellules incubées en hypoxie étoposide est intermédiaire. L'activation de p53 en présence d'étoposide est bien connue puisque les dommages à l'ADN activent ce facteur de transcription (voir point I.1.2.4.3). Par contre, une diminution de son activité en hypoxie est rarement décrite (Achison & Hupp, 2003).

Le facteur de transcription AP-1 peut, notamment, être un homodimère c-jun ou un hétérodimère c-fos/c-jun. Le profil d'activation de ces deux protéines est très différent. En ce qui concerne c-jun, des résultats variables sont obtenus. En normoxie, la liaison à l'ADN n'est pas affectée par l'étoposide alors que l'abondance de la protéine semble augmenter dans cette condition. Les résultats obtenus par TFChipMAPK et par immunofluorescence concernant l'effet de l'hypoxie montrent une augmentation de la liaison à l'ADN et de la quantité de protéines alors que, par Trans-AM, on obtient une valeur inférieure à celle obtenue en normoxie. Une surexpression de la protéine c-jun en hypoxie avait déjà été mise en évidence au laboratoire (Minet et al., 2001). Par contre, les résultats obtenus par toutes les techniques sont similaires quant à l'effet d'une incubation en hypoxie en présence d'étoposide : la liaison à l'ADN et l'abondance protéique sont augmentées. En ce qui concerne c-fos, on observe une liaison à l'ADN de plus en plus grande de normoxie à hypoxie, normoxie étoposide et hypoxie étoposide. L'observation en immunofluorescence d'une abondance plus faible de la protéine en hypoxie sans étoposide n'est donc pas en corrélation avec le profil obtenu par Trans-AM. Le profil d'induction obtenu pour AP-1 en système rapporteur correspond à celui observé pour c-jun sur la TFChipMAPK. Une activation d'AP-1 par l'hypoxie avait également déjà été mise en évidence sur différents types cellulaires dont les HepG2. (Minet et al., 2001 ; Faller, 1999). L'étoposide et l'hypoxie ont été décrits pour activer la JNK (Minet et al., 2001 ; Brantley-Finley et al., 2003) et ce serait via cette JNK qu'AP-1 est activé en hypoxie. Brantley-Finley et al. (2003) décrivent qu'une inhibition de la JNK protège des cellules de carcinome contre la cytotoxicité de l'étoposide. Cependant, bien que la JNK soit activée, ils n'observent pas de phosphorylation de c-jun ni d'activation d'AP-1, ce qui est conforme aux résultats que nous avons obtenus par différentes techniques en normoxie étoposide. Des variations dans la composition du dimère formé selon les conditions pourraient intervenir dans l'explication des différents résultats obtenus.

En ce qui concerne le facteur de transcription Elk-1, les résultats obtenus par Trans-AM et TFChipMAPK sont assez semblables, c'est-à-dire une diminution importante de la liaison à l'ADN en hypoxie et une légère augmentation lors de l'ajout d'étoposide. Il serait

intéressant de mesurer l'activité de ce facteur de transcription par système rapporteur dans la suite du travail.

Les sites CRE sont liés par les facteurs de transcription CREB et/ou ATF-2. La liaison d'ATF-2 à l'ADN est diminuée lors de l'ajout d'étoposide et légèrement augmentée en hypoxie avec une valeur proche de la normoxie pour la condition hypoxie étoposide. Ceci n'est donc pas en accord avec ce que les résultats obtenus en immunofluorescence suggéraient puisque l'abondance nucléaire de la protéine semblait être plus grande en hypoxie étoposide que dans les autres conditions. Seko et al. (1997) décrivent que l'hypoxie provoque la phosphorylation d'ATF-2. Pour CREB également, les résultats obtenus par immunofluorescence et par Trans-AM sont différents. L'abondance de la protéine semble plus élevée en normoxie alors que sa liaison à l'ADN est plutôt plus élevée en hypoxie. L'hypoxie chronique est décrite pour faciliter la phosphorylation de CREB dans plusieurs types cellulaires (Kumar & Klein, 2004 ; Beitner-Johnson et al., 1998 ; Mishra et al., 2002). Le profil d'induction obtenu par système rapporteur est beaucoup plus proche de celui obtenu pour ATF-2 que de celui observé pour CREB quand on mesure leur liaison à l'ADN.

La liaison à l'ADN de MEF-2 est diminuée par l'hypoxie alors que l'ajout d'étoposide ne semble pas avoir d'effet sur cette liaison.

En ce qui concerne le facteur de transcription c-myc, les valeurs obtenues grâce à la TFChipMAPK sont trop faibles pour pouvoir tirer des conclusions.

Pour STAT-1, la liaison à l'ADN et l'abondance nucléaire ne semblent être importantes que lorsque de l'étoposide est ajouté en condition d'hypoxie.

Quant à NFATc1, sa liaison à sa séquence consensus n'a été détectée dans aucune des quatre conditions étudiées.

Les résultats obtenus pour le facteur de transcription NF- κ B sont difficiles à interpréter. La liaison à l'ADN de la sous-unité p50 ne semble pas vraiment être influencée par les conditions étudiées. L'abondance nucléaire de la sous-unité p65 semble plus grande en hypoxie. Lors de l'utilisation d'un système rapporteur, on obtient des résultats différents. En effet, l'ajout d'étoposide engendre un doublement de l'activité du facteur en normoxie et un triplement en hypoxie alors que l'hypoxie seule n'a pas d'effet. Tantini et al. (2004) ont également observé un effet activateur important de l'étoposide sur NF- κ B et ceci chez des fibroblastes. Par contre, Hall et al. (2001), qui travaillent sur des cellules stromales de moelle osseuse, décrivent une diminution de la liaison à l'ADN de NF- κ B en présence d'étoposide. Quant à l'effet de l'hypoxie sur l'activation de NF- κ B, des résultats contradictoires sont décrits dans la littérature. Différents auteurs décrivent une activation de ce facteur en hypoxie (Shi et al., 1999 ; Zampetaki et al. 2004 ; Lukiw et al., 2003 ; Koong et al., 1994) alors que d'autres observent son activation seulement après une réoxygénation consécutive à une période d'hypoxie (Rupic & Baeuerle, 1995 ; Faller, 1999). Il faut noter que NF- κ B peut être constitué de la combinaison de différentes sous-unités, ce qui rend l'interprétation des résultats difficile.

Une activation du facteur de transcription HIF-1 est observée en hypoxie et l'étoposide ne semble pas avoir d'influence importante sur cette activation.

L'hypoxie et l'étoposide semblent donc affecter l'abondance et la liaison à l'ADN d'un grand nombre de facteurs de transcription de manière différente qu'ils soient présents seuls ou combinés, mais également en fonction de la nature de ce facteur. Les répercussions de

ces activations différentielles sur les changements d'expression géniques observés au point III.2 seront abordées de manière préliminaire dans la dernière partie de ce travail.

III.4 Analyse *in silico* du promoteur des gènes d'intérêt

III.4.1 Description de la méthode d'analyse

18 gènes ont été sélectionnés à partir de l'analyse des résultats obtenus par la « DualChipTM human apoptosis ». Il s'agit de gènes dont l'induction en normoxie étoposide et en hypoxie étoposide, par rapport à la normoxie dans les deux cas, est la plus différente. Les promoteurs de ces gènes humains ont été recherchés sur la base de donnée GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La séquence présente en amont de la séquence codant pour l'ARNm a été sélectionnée.

Afin de retrouver les sites consensus des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B, CREB, STAT1, Elk-1 et c-myc dans les séquences promotrices, le programme en ligne TFSEARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>) a été utilisé. En ce qui concerne le facteur de transcription STAT, il est à noter que le programme recherche les sites consensus de STATx qui comprend plusieurs membres de la famille STAT dont STAT-1. Par ailleurs, une recherche manuelle des sites consensus pour HIF-1, NFATc1 et MEF-2 a été effectuée à l'aide du logiciel « DNA strider ». Aucun site consensus NFATc1 n'a été détecté mais il est probable que ceci est dû au fait que notre recherche a été effectuée sur une séquence consensus précise, sans tolérer aucune variation par rapport à celle-ci. Enfin, le site <http://linkage.rockefeller.edu/p53> a été utilisé pour rechercher les sites consensus pour p53.

III.4.2 Analyse des résultats obtenus

Les résultats obtenus sont présentés au Tableau III.4. Nous pouvons maintenant essayer de corrélérer les profils d'induction de ces gènes avec les profils d'activation des facteurs de transcription étudiés (voir Tableau III.3).

On observe que les variations d'expression du gène BNIP3 a exactement la même tendance que les variations d'activité du facteur de transcription HIF-1. Le promoteur de ce gènes contient d'ailleurs plusieurs sites de fixation potentiels pour ce facteur de transcription. BNIP3 est connu pour être un gène cible de HIF-1 (Bruick, 2000)

Les gènes BAX, MDM2, BAK1, CDKN1A et GPX1 sont induits en présence d'étoposide, quelle que soit la tension en oxygène. Il s'agit d'un profil similaire à celui obtenu concernant l'activité de p53. L'augmentation de l'expression de ces gènes, ainsi que l'activité de ce facteur sont d'ailleurs moins prononcées en hypoxie étoposide qu'en normoxie étoposide et ce, de façon parallèle. La plupart de ces gènes sont connus pour être des gènes cibles de p53 et nous avons effectivement retrouvé au moins un site de liaison potentiel pour ce facteur dans leur promoteur. Les variations d'expression de ces gènes dans les quatre conditions étudiées sont donc probablement attribuables à p53.

Les 5 premiers gènes du Tableau III.4 (CLK1, GADD45A, IGF2, IGFBP4 et MCL-1) sont induits dans toutes les conditions par rapport à la normoxie. Aucun des facteurs de transcription étudiés ne possède de profil d'activité semblable. On pourrait imaginer que ce soit la combinaison de plusieurs facteurs, comme p53 et HIF-1, qui exerceraient leurs effets pour donner le profil observé. Cependant, ces gènes ne semblent pas tous posséder des sites de liaison pour ces deux facteurs de transcription. Cela suggérerait soit que nous n'avons pas considéré une longueur de promoteur suffisamment longue, soit qu'un ou plusieurs autres facteurs de transcription interviendraient.

Le facteur de transcription AP-1 possède un profil d'activité comparable au profil d'expression du gène JUN. L'expression de ce gène pourrait donc dépendre de ce facteur. Cependant, aucun site potentiel de reconnaissance par ce facteur de transcription n'a été trouvé dans son promoteur. Il est néanmoins connu que le gène JUN peut être régulé par AP-1, engendrant ainsi une boucle de rétroaction positive (Minet et al, 2001).

Les autres gènes étudiés possèdent un profil d'expression qui ne corrèle avec le profil d'activité d'aucun des facteurs de transcription étudiés.

Le facteur de transcription STAT-1 est activé principalement en hypoxie en présence d'étoposide. Parmi les gènes étudiés, aucun ne possède ce profil d'induction. Il serait intéressant d'étendre l'étude d'expression à d'autres gènes pour vérifier si ce facteur est bien actif en condition d'hypoxie étoposide.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il semble donc que les facteurs de transcription principaux influençant l'expression des gènes dans les conditions étudiées soient p53, HIF-1 et AP-1. Nous n'excluons cependant pas que d'autres facteurs soient également impliqués.

IV. Conclusion et perspectives

L'apparition d'une tumeur provient de la prolifération d'une cellule qui a subi différentes mutations l'ayant amenée à se diviser de manière incontrôlée, engendrant ainsi une tumeur en croissance. Les tumeurs de taille supérieure à 1 mm³ possèdent une région hypoxique en leur centre car celui-ci se trouve trop éloigné des vaisseaux sanguins responsables de l'apport en oxygène. Lorsque les cellules perçoivent un déficit en oxygène, toute une série de processus vont être activés alors que d'autres sont inhibés. Une adaptation est en effet nécessaire puisqu'une des fonctions importantes de l'oxygène au niveau cellulaire est de servir d'accepteur final d'électrons de la chaîne de transporteurs d'électrons. La production d'ATP sera donc réduite en hypoxie. Pour limiter ses dépenses énergétiques, la cellule inhibe alors la synthèse de protéines et d'ARN/ADN (Michiels, 2004). Certaines voies menant à la transcription de gènes spécifiques et à leur traduction sont néanmoins activées. Ainsi, l'activation du facteur de transcription HIF-1 et la transcription de ces gènes cibles permettent notamment d'augmenter la disponibilité en oxygène dans les tissus et de régénérer l'ATP en absence d'oxygène en activant la glycolyse. Cependant, l'hypoxie modifie également l'activité d'autres facteurs de transcription tels que AP-1, p53 et NF- κ B, dont l'action peut également être importante (Guillemin and Krasnow, 1997 ; Faller, 1999).

Une autre caractéristique essentielle de ces cellules cancéreuses est leur résistance à l'apoptose. La plupart des thérapies anti-cancéreuses ont pour but de provoquer l'apoptose de ces cellules. Cependant, il a été observé que l'hypoxie tumorale diminue l'efficacité de certaines de ces thérapies, dont la chimiothérapie, et accélère le caractère malin de la tumeur ainsi que la formation de métastases (Brown, 1999 ; Koukourakis et al., 2001 ; Weinmann et al., 2004). Cependant, peu d'éléments sont connus quant aux mécanismes d'action de l'hypoxie sur l'apoptose des cellules tumorales. Il semble que, lorsqu'elle n'est pas trop sévère, l'hypoxie est capable de protéger les cellules contre l'apoptose induite de différentes manières. En effet, il a notamment été montré au laboratoire que l'hypoxie protège les cellules HepG2 contre l'apoptose induite par la privation en sérum et le *tert*-butyl hydroperoxyde, un agent oxydant (Piret et al., 2004). Une telle protection a également été décrite pour d'autres types cellulaires (Chung et al., 2004 ; Risbud et al., 2005 ; Leuenroth et al., 2000). Si une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 a été montrée dans certains cas (Piret et al., 2005 ; Leuenroth et al., 2000), elle n'explique pas à elle-seule l'effet protecteur de l'hypoxie observé dans ces différentes conditions.

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose induite par l'étoposide, un agent pro-apoptotique, dans des cellules HepG2. En effet, des données préliminaires obtenues au laboratoire indiquaient que l'hypoxie protège ces cellules de l'apoptose induite par cette molécule (Piret, 2005, thèse de doctorat). Cependant, cette protection n'est pas encore comprise. La compréhension des mécanismes menant à cette protection pourrait peut-être permettre, à terme, de trouver des solutions pour contrecarrer la diminution d'efficacité des chimiothérapies observées en hypoxie dans différentes tumeurs humaines. En effet, l'étoposide est une molécule qui inhibe la topoisomérase II provoquant ainsi des dommages à l'ADN qui mènent à l'activation de la protéine p53. Il s'agit d'une molécule couramment utilisée chez l'homme pour le traitement de différents types de cancers (Meresse et al., 2004). Afin de dégager des pistes pouvant mener à une meilleure compréhension de ce mécanisme, une approche transcriptomique a été utilisée.

Dans la première partie du travail, nous avons montré que l'hypoxie protège bien les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide. Pour cela, nous avons étudié l'effet de l'hypoxie, en présence d'étoposide, sur l'activation des caspases, le clivage de la protéine PARP et la fragmentation de l'ADN. Il s'agit en effet de trois événements observés spécifiquement dans les cellules en apoptose. Ces expériences ont été effectuées après une incubation de 16 h des cellules dans quatre conditions différentes : en normoxie et en hypoxie, en présence ou non d'étoposide à une concentration de 50 μ M. L'activité des caspases a été mesurée via la fluorescence de la rhodamine 110 après le clivage d'un substrat DEVD-rhodamine 110 mis en contact avec les cellules lysées. L'activité de la caspase 3 a également été évaluée par immunofluorescence en marquant de manière spécifique la caspase 3 active. Nous avons ensuite étudié le clivage de la protéine PARP dans les différentes conditions par la détection du fragment clivé en Western Blot. Cette enzyme, qui effectue des réparations dans l'ADN, est clivée par les caspases lors du processus apoptotique. L'apoptose activant différentes nucléases, la fragmentation de l'ADN a également été évaluée par un test de type ELISA détectant les nucléosomes solubles. Ces différentes approches expérimentales ont donné des résultats tout à fait similaires, c'est-à-dire que l'hypoxie seule ne provoque pas plus d'apoptose que la normoxie mais, qu'en présence d'étoposide, un nombre de cellules plus faible entre en apoptose en hypoxie qu'en normoxie. Nous avons donc pu vérifier par ces différentes approches que l'hypoxie protège bien les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide.

Le rôle propre de l'hypoxie dans la modulation de l'apoptose reste controversé dans la littérature. L'hypoxie est cependant très souvent considérée comme un facteur pro-apoptotique. En effet, s'il est bien connu que l'hypoxie tumorale diminue l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses *in vivo*, il est également décrit qu'une hypoxie trop sévère ou trop prolongée provoque l'apoptose ou la nécrose (Riva et al., 1998 ; Nagaraj et al., 2004). *In vitro*, l'hypoxie est également souvent considérée comme un facteur induisant l'apoptose, principalement via l'activation de p53 (el-Deiry, 1998 ; Koumenis et al., 2001 ; Graeber et al., 1994). Cependant, différents auteurs décrivent que, lorsqu'elle n'est pas trop sévère ni trop prolongée, l'hypoxie peut apporter une protection contre l'apoptose (Piret et al., 2004 ; Chung et al., 2004 ; Risbud et al., 2005 ; Leuenroth et al., 2000). En fonction de sa sévérité, l'hypoxie serait donc pro- ou anti-apoptotique. Les conditions expérimentales utilisées dans notre travail sont relativement « douces » et nous avons montré qu'elle étaient nettement anti-apoptotiques.

Afin de mettre en évidence des gènes qui pourraient intervenir dans la protection apportée par l'hypoxie contre l'apoptose induite par l'étoposide, nous avons étudié, dans la deuxième partie de notre travail, l'expression de 123 gènes dont la protéine correspondante intervient dans la régulation du processus apoptotique. Pour cela, la « DualChipTM human apoptosis » a été utilisée et les variations d'expression de quelques gènes ont été confirmées par Real-Time PCR. Cette approche nous a permis de détecter l'induction d'un grand nombre de gènes, en présence d'étoposide, dont beaucoup sont connus pour être des gènes cibles de p53, comme CDKN1A, MDM2, GPX-1, BAX et GADD45A. En effet, un des effets les mieux connus de l'étoposide est de provoquer l'activation du facteur de transcription p53. D'autres gènes sont également activés dans cette condition dont l'inhibiteur d'apoptose BIRC3, la kinase CLK-1, IGFBP4, ainsi que le TNFRSF6 (Fas). En hypoxie, on constate une diminution globale de l'expression des gènes. Cependant, on retrouve l'induction de plusieurs gènes cibles du facteur de transcription HIF-1 dont l'agent anti-apoptotique MCL-1, l'aldolase (ALDOA) et BNIP3, une protéine pro-apoptotique (Piret et al., 2005 ; Semenza, 2003 ; Bruick, 2000). Une augmentation de l'expression d'autres gènes est également observée, notamment pour JUN, CLK-1 et MAP2K1. L'induction de gènes cibles de p53 en

présence d'étoposide et celle de gènes cibles de HIF-1 en hypoxie nous permet de valider cette technique.

Les résultats observés en hypoxie en présence d'étoposide sont globalement plus similaires à ceux obtenus en hypoxie qu'à ceux obtenus en normoxie étoposide. L'effet de l'hypoxie serait donc dominant sur celui de l'étoposide pour l'expression de ces gènes dont les produits interviennent dans la modulation de l'apoptose. Ceci confirme que l'hypoxie peut avoir un effet important sur la régulation de l'apoptose. Cependant, l'hypoxie ne semble pas avoir d'effet sur l'expression des gènes BAX, IGFBP2, MDM2 et TNFRSF6 qui sont induits par l'étoposide. Pour d'autres (BAK1, CDKN1A, GPX1, CDC2 et PCNA), on observe une induction forte provoquée par l'étoposide mais cette induction est diminuée, sans toutefois être annulée, par l'hypoxie. BAK1, CDKN1A et GPX1 ont ensuite été étudiés aux niveaux ARN et protéique. Il serait également intéressant d'étudier de manière plus approfondie CDC2 et PCNA. AKT2 et E2F5 présentant tous les deux une expression variable dans les différentes conditions étudiées, nous pourrions également nous y intéresser.

Certains de ces gènes présentent donc un profil d'induction correspondant au degré d'apoptose observé dans les expériences décrites dans la première partie. Un lien de cause à effet reste cependant à être démontré. Dans la suite de ce travail, nous pourrions essayer de déterminer si certains de ces gènes sont en effet impliqués dans la protection contre l'apoptose observée en hypoxie. Pour cela, nous pourrions inhiber l'expression de gènes anti-apoptotiques par l'utilisation de siRNA et observer si la protection contre l'apoptose apportée par l'hypoxie est perdue.

Ensuite, l'abondance de protéines correspondant à certains des gènes ainsi étudiés a été estimée par Western Blot afin de vérifier si l'abondance protéique varie de manière parallèle à l'abondance de l'ARNm. C'est bien le cas pour p53 et CDKN1A/p21 mais pas pour les trois autres gènes et protéines étudiés. En ce qui concerne c-jun, la tendance observée est la même au niveau protéique et au niveau de l'ARNm, à part en normoxie en présence d'étoposide où l'augmentation de la quantité de protéine est beaucoup plus importante que ne l'est l'augmentation de l'abondance de l'ARNm. Ceci pourrait être expliqué, par exemple, par une stabilité accrue de l'ARNm. Quant à Mdm2 et Bak1, des différences fort importantes sont observées entre ces deux niveaux protéique et ARN. Au niveau de l'ARNm de MDM2, la présence d'étoposide ainsi que l'hypoxie ont un effet inducteur alors que ces deux stress provoquent une diminution de l'abondance protéique. Arriola et al. (1999), qui travaillent sur différentes lignées cellulaires, observent aussi une inhibition de l'induction de Mdm2 par l'étoposide au niveau protéique mais également au niveau de l'ARN, contrairement à nos observations. La quantité de protéine Bak1 et celle de son ARNm sont augmentées en présence d'étoposide. Par contre, l'hypoxie provoque une diminution de la quantité d'ARNm alors qu'une augmentation de la quantité de protéine est observée. Ces résultats mettent en évidence qu'une grande différence peut exister entre le niveau d'expression du transcrit et le niveau d'expression de la protéine correspondante. Pradet-Balade et al. (2001) ont montré qu'il existe souvent peu de corrélation entre les abondances des ARNm et de leurs protéines correspondantes. Il est en effet connu que diverses régulations peuvent exister entre ces deux niveaux. Citons notamment l'export du noyau de l'ARNm, sa localisation, la stabilité du transcrit, la régulation traductionnelle et la dégradation protéique. De plus, d'autres modifications post-traductionnelles sont parfois nécessaires pour obtenir une protéine fonctionnelle. Il sera donc nécessaire d'étudier l'expression des protéines correspondant aux autres gènes d'intérêt dans la suite de ce travail.

La régulation de l'expression génique passe par l'activité de différents facteurs de transcription. Afin de déchiffrer quelles voies de signalisation aboutissant à ces facteurs de transcription sont modulées par l'hypoxie et l'étoposide, nous nous sommes intéressés, dans la troisième partie, à suivre l'activité de plusieurs facteurs de transcription dans les différentes conditions étudiées. Pour cela, quatre approches ont été utilisées. La liaison à l'ADN a été évaluée grâce à la TFChipMAPK et/ou par dosage Trans-AM ; l'abondance et la localisation subcellulaire a été estimée par immunofluorescence ; et enfin, des systèmes rapporteurs ont été utilisés afin de vérifier l'activité transcriptionnelle effective de ces facteurs.

Le principal facteur de transcription décrit pour être activé par l'hypoxie est HIF-1. Nos résultats montrent que c'est également le cas dans nos conditions expérimentales. De manière intéressante l'étoposide n'influence pas son activité. Ces résultats signifient que, comme l'activité transcriptionnelle de HIF-1 est la même en présence et en absence d'étoposide, certains de ces gènes cibles favorisant la survie des cellules pourraient participer à l'action anti-apoptotique de l'hypoxie. On pourrait vérifier cette hypothèse par exemple en inhibant l'expression de la sous-unité HIF-1 α par siRNA afin d'en étudier la répercussion sur la protection contre l'apoptose apportée par l'hypoxie.

Le principal facteur de transcription connu pour être activé par l'étoposide est p53. Les différentes approches utilisées pour déterminer l'activité de ce facteur nous permettent effectivement de montrer une augmentation de son activité lors de l'ajout d'étoposide. Par ailleurs, une diminution de l'activité de ce p53 est observée en hypoxie, ce qui est contradictoire avec de nombreuses études (el-Deiry, 1998 ; Koumenis et al., 2001 ; Graeber et al., 1994). Cependant, dans ces travaux, les conditions d'hypoxie sont plus sévères que les nôtres et induisent l'apoptose des cellules de manière dépendante de p53.

L'activité d'autres facteurs de transcription a également été étudiée. Les résultats obtenus pour trois d'entre eux nécessitent d'être approfondis. L'activité du facteur de transcription Elk-1 est légèrement augmentée par l'étoposide et fortement diminuée par l'hypoxie. Dans la suite de ce travail, il serait intéressant de mesurer son activité par système rapporteur. Les résultats obtenus concernant l'activité de CREB et d'ATF-2 sont variables selon les approches utilisées. Cependant, le profil d'induction obtenu avec un système rapporteur CRE est assez proche de celui obtenu lors de la mesure de la liaison à l'ADN de ATF-2, c'est-à-dire une activité fortement augmentée en hypoxie et légèrement diminuée par l'étoposide. Ce serait donc ce facteur qui est activé dans ces conditions. Quant au facteur NF- κ B, des résultats peu cohérents et donc difficiles à interpréter sont obtenus. Ce facteur pouvant être constitué de différentes sous-unités, une étude plus approfondie de la liaison à l'ADN et de la translocation nucléaire de chacune d'entre-elles pourrait être intéressante.

En ce qui concerne les facteurs de transcription MEF-2, c-myc, STAT-1 et NFATc1, peu de conclusions peuvent être tirées, à part que l'hypoxie semble activer MEF-2, que l'hypoxie en présence d'étoposide active STAT-1 et que, quelle que soit la condition étudiée, le facteur NFATc1 n'est pas détecté.

Finalement, les résultats obtenus pour AP-1 méritent plus d'attention. On observe que ce facteur de transcription est activé en hypoxie, conformément à ce qui a déjà été décrit pour différents types cellulaires (Minet et al., 2001 ; Faller, 1999). Ce serait via l'activation de la JNK que c-jun serait phosphorylé et que AP-1 serait activé (Minet et al., 2001). Par ailleurs, l'étoposide ne semble pas avoir d'effet en normoxie. Brantley-Finley et al. (2003), qui font la même observation, décrivent néanmoins que la JNK est activée dans cette condition. C'est en hypoxie en présence d'étoposide que l'activité d'AP-1 est la plus grande. L'activation de ce facteur semble dépendre principalement de c-jun plutôt que de c-fos. On constate en effet que

le profil d'activation d'AP-1 est plus proche de l'activité de liaison à l'ADN de c-jun que de celle de c-fos.

Les résultats obtenus ici pourraient être complétés en étudiant l'activation des facteurs de transcription par système rapporteur pour ceux pour lesquels cela n'a pas encore été fait. Ensuite, il est important de remarquer que plusieurs des facteurs de transcription étudiés peuvent se composer de différentes sous-unités. Des études complémentaires seraient donc nécessaires pour déterminer quelle(s) sous-unité(s) joue(nt) un rôle prédominant dans l'activation du facteur en question.

Enfin, dans la dernière partie, nous avons tenté d'établir des corrélations entre les profils d'expression des gènes, les profils d'activation des facteurs de transcription et la présence de sites consensus pour les facteurs de transcription dans le promoteur des gènes. Un tableau reprenant ces comparaisons est présenté ci-contre (Fig. IV.1). On peut en effet établir certaines corrélations.

Le profil d'expression obtenu pour les gènes BAX, CDKN1A, BAK1, PCNA, GPX1 et MDM2 est le même que le profil d'activité du facteur de transcription p53 qui est lui-même identique au degré d'apoptose. Tous ces gènes, sauf peut-être PCNA, possèdent en effet au moins un site potentiel de liaison pour p53 dans leur promoteur et la plupart sont connus pour être des gènes cibles de ce facteur de transcription.

Les gènes BNIP3, ALDOA et MAP2K1 présentent un profil d'induction similaire au profil d'activation de HIF-1. Il est en effet connu que BNIP3 et l'aldolase sont des gènes cibles de HIF-1 (Bruick, 2000 ; Semenza, 2003).

Les gènes JUN et ING possèdent un profil qui se rapproche de celui de l'activité du facteur de transcription AP-1. L'expression de ces deux gènes pourrait donc peut-être dépendre de ce facteur. Il est en effet décrit que l'expression du gène JUN peut dépendre d'AP-1, engendrant ainsi une boucle de rétroaction positive (Minet et al., 2001).

Il faut cependant noter qu'il y a également des gènes dont le profil d'expression ne ressemble à aucun profil d'activité des facteurs de transcription que nous avons étudiés. Deux paires d'exemples sont illustrés à la figure IV.1 : IGF2 et IGFBP4 sont fortement surexprimés en présence d'étoposide seulement en normoxie, tandis que MCL1 et CLK1 voient leur expression augmenter en présence d'étoposide, en hypoxie seule, et encore plus quand les deux conditions sont présentes. Ces surexpressions de MCL1 et CLK1 pourraient être dues à l'activation d'un facteur de transcription dont nous n'avons pas encore étudié l'activité, ou à l'action conjuguée de HIF-1 et p53. Il faudra alors retrouver un site de liaison pour chacun d'eux dans leur promoteur. C'est effectivement le cas pour MCL1 mais l'étude reste à faire pour CLK1.

Il est néanmoins important de remarquer que notre étude peut être biaisée par le fait que la mesure de l'activation des facteurs de transcription n'est effectuée qu'après 16 h d'incubation et que nous n'avons ainsi pas d'information sur la cinétique de leur activité. Il est en effet possible qu'un facteur de transcription soit activé dans les premières heures d'incubation, engendrant ainsi la transcription de ses gènes cibles, et qu'après 16 h, le facteur de transcription ne soit plus activé alors que les ARNm de ces gènes cibles soient toujours présents. Une étude de la cinétique d'activation des facteurs de transcription d'intérêt serait donc utile.

Dans la suite de ce travail, cette étude de comparaison de profils d'induction de gènes et d'activité de facteurs de transcription pourrait être effectuée à grande échelle par « cluster analysis ».

Différents facteurs de transcription pourraient donc intervenir dans l'explication de la protection apportée par l'hypoxie contre l'apoptose induite par l'étoposide. Plusieurs auteurs décrivent des actions pro- ou antiapoptotiques pour certains de ces facteurs. Abramovitch et al. (2004) décrivent que CREB apporte une résistance à l'apoptose dans des carcinomes hépatocellulaires. Cependant, l'action de ce facteur ne semble pas prépondérante dans notre étude. En ce qui concerne NF- κ B, Tantini et al. (2004), qui travaillent sur des fibroblastes, observent qu'une inhibition de ce facteur de transcription empêche l'activation des caspases et la mort cellulaire. Différents auteurs précisent également que l'activation de NF- κ B est une réponse anti-apoptotique fréquente des cellules soumises à la chimiothérapie (Brantley-Finley et al., 2003 ; Arlt et al., 2001).

Les facteurs de transcription qui semblent les plus probablement impliqués dans la protection observée sont p53, HIF-1 et AP-1 (Fig. IV.1). Comme décrit plus haut, p53 et plusieurs de ses gènes cibles possèdent un profil d'induction similaire au degré d'apoptose observé. Plusieurs produits de ces gènes, dont BAX et BAK1, sont bien connus pour être des facteurs pro-apoptotiques puissants. L'hypoxie ayant pour effet de diminuer l'activité de p53, et donc l'abondance du transcrit de ces protéines pro-apoptotiques, elle posséderait ainsi un effet anti-apoptotique important.

Les effets pro- ou anti-apoptotiques du facteur de transcription HIF-1 sont controversés. Ces effets dépendraient principalement du type cellulaire et des conditions expérimentales. En effet, une hypoxie sévère et/ou prolongée engendre l'apoptose alors qu'une hypoxie plus « douce » favoriserait la survie cellulaire, notamment par l'intermédiaire de HIF-1 (Piret et al., 2002b) (voir point I.3). Dans nos résultats, nous observons également cette opposition. Le gène BNIP3, dont le produit est une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 surexprimée en hypoxie, est bien connu pour être un gène cible de HIF-1, donnant ainsi un rôle pro-apoptotique à HIF-1 (Bruick, 2000). Le gène JUN pourrait également dépendre de ce facteur de transcription. Le produit de ce gène, c-jun, est une protéine entrant dans la composition du facteur de transcription AP-1 dont les effets sont commentés ci-dessous. Cependant, HIF-1 régule aussi l'expression de Mcl-1 (Piret et al., 2005), dont la surexpression est effectivement détectée ici. Mcl-1 est un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Ce sera donc l'intégration des signaux engendrés par ces différentes protéines qui fera pencher la balance soit du côté pro- soit du côté anti-apoptotique.

En ce qui concerne AP-1, son effet pro- ou anti-apoptotique est également controversé dans la littérature (Shaulian & Karin, 2002 ; Ameyar et al., 2003). Il est, par exemple, décrit que l'injection d'une isoforme dominant négatif de c-jun dans des neurones empêche l'apoptose de neurones privés de NGF, indiquant ainsi un rôle pro-apoptotique à AP-1 (Ham et al., 1995). De même Kolbus, et al. (2000) indiquent qu'AP-1, ou au moins c-jun, est indispensable à la mort cellulaire médiée par FasL dans des fibroblastes murins. Cependant, différentes études, notamment réalisées en utilisant des souris *knockout*, montrent qu'AP-1 est d'une grande importance dans les processus de survie cellulaire de cellules hépatiques. De plus, des expériences génétiques montrent que les protéines Jun peuvent inhiber l'apoptose dépendante de p53 par un mécanisme encore peu compris et que c-jun peut également moduler p53 en réprimant la transcription au niveau du promoteur du gène tp53 (Ameyar et al., 2003). L'action pro- ou anti-apoptotique d'AP-1 semble donc dépendre fortement du contexte cellulaire. Le fait que ce facteur puisse être constitué de plusieurs sous-unités qui peuvent être exprimées et régulées de manières différentes rend le problème encore plus complexe (Ameyar et al., 2003).

En conclusion, ce travail nous a permis de montrer que l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide. Une étude de l'activité de différents facteurs de transcription et de l'expression de gènes dont les produits interviennent dans la modulation de l'apoptose ainsi que des corrélations entre ces facteurs et ces gènes a été réalisée en prenant également en compte la présence de sites consensus potentiellement reconnus par ces facteurs de transcription dans le promoteur de ces gènes. L'ensemble des résultats suggère que les facteurs de transcription HIF-1, p53 et AP-1 pourraient jouer un rôle important dans la régulation des gènes impliqués dans l'apoptose dans les conditions étudiées, même s'il n'est pas exclu que d'autres facteurs puissent intervenir. Néanmoins, aucun rapport direct entre le degré d'apoptose observé et un facteur de transcription ou un gène particulier ne peut encore être établi. Dans la suite de ce travail il pourra être intéressant de compléter l'étude en étudiant d'autres facteurs de transcription et d'autres gènes et de tester tous les facteurs de transcription en système rapporteur. Une inhibition de certains gènes induits en hypoxie étoposide et ayant un rôle potentiellement anti-apoptotique permettrait de déterminer si ceux-ci jouent effectivement un rôle dans la protection observée.

S'il est connu que les conditions d'hypoxie régnant au sein des tumeurs diminuent l'efficacité des chémo- et radio-thérapies, les mécanismes sous-jacents restent peu clairs. Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent que si l'hypoxie protège effectivement les cellules cancéreuses de l'apoptose engendrée par un agent utilisé en chimiothérapie, les effets qu'elle engendre au niveau de l'activité de différents facteurs de transcription et des changements d'expression génique sont complexes. Ces études sont néanmoins utiles afin de dégager des pistes utilisables à long terme afin d'améliorer l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses.

Bibliographie

Articles scientifiques

- Abramovitch, R. et al. A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression. *Cancer Res* **64**, 1338-46 (2004).
- Achison, M. & Hupp, T. R. Hypoxia attenuates the p53 response to cellular damage. *Oncogene* **22**, 3431-40 (2003).
- Adams, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**, 2481-95 (2003).
- Ameyar, M., Wisniewska, M. & Weitzman, J. B. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* **85**, 747-52 (2003).
- Antonsson, B. & Martinou, J. C. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* **256**, 50-7 (2000).
- Arlt, A. et al. Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* **20**, 859-68 (2001).
- Arriola, E. L., Lopez, A. R. & Chresta, C. M. Differential regulation of p21waf-1/cip-1 and Mdm2 by etoposide: etoposide inhibits the p53-Mdm2 autoregulatory feedback loop. *Oncogene* **18**, 1081-91 (1999).
- Beasley, N. J. et al. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* **62**, 2493-7 (2002).
- Beitner-Johnson, D. & Millhorn, D. E. Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism. *J Biol Chem* **273**, 19834-9 (1998).
- Brahimi-Horn, C., Berra, E. & Pouyssegur, J. Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol* **11**, S32-6 (2001).
- Brantley-Finley, C. et al. The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochem Pharmacol* **66**, 459-69 (2003).
- Brown, J. M. The Hypoxic Cell: A target for Selective Cancer Therapy-Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer research* **59**, 5863-70 (1999).
- Bruick, R. K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9082-7 (2000).
- Burden, D. A. & Osherooff, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1400**, 139-54 (1998).
- Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169-93 (2000).
- Chung, J., Yoon, S., Datta, K., Bachelder, R. E. & Mercurio, A. M. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor transcription and protection from apoptosis are dependent on alpha6beta1 integrin in breast carcinoma cells. *Cancer Res* **64**, 4711-6 (2004).
- el-Deiry, W. S. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* **8**, 345-57 (1998).
- Faller, D. V. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**, 74-84 (1999).
- Ferri, K. F. & Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**, E255-63 (2001).
- Gewies, A. Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, 1-26 (2003).
- Gleadle, J. & Ratcliffe, P. Hypoxia. *Encyclopedia of life Sciences* (2001).
- Gothié, E. & Pouyssegur, J. HIF-1: régulateur central de l'hypoxie. *Medecine/Sciences* **18**, 70-8 (2002).
- Graeber, T. G. et al. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* **14**,

6264-77 (1994).

Gross, A., McDonnell, J. M. & Korsmeyer, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-911 (1999).

Guillemin, K. & Krasnow, M. A. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* **89**, 9-12 (1997).

Hall, B. M., Fortney, J. E. & Gibson, L. F. Alteration of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) expression in bone marrow stromal cells treated with etoposide. *Biochem Pharmacol* **61**, 1243-52 (2001).

Ham, J. et al. A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* **14**, 927-39 (1995).

Han, T. H. & Prywes, R. Regulatory role of MEF2D in serum induction of the c-jun promoter. *Mol Cell Biol* **15**, 2907-15 (1995).

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).

Hande, K. R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* **34**, 1514-21 (1998).

Heinemeyer, T. et al. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* **26**, 362-7 (1998).

Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-6 (2000).

Hoh, J. et al. The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8467-72 (2002).

Jiang, X. & Wang, X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**, 87-106 (2004).

Jin, S. & Levine, A. J. The p53 functional circuit. *J Cell Sci* **114**, 4139-40 (2001).

Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. & Lowe, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**, 153-64 (2002).

Karin, M. & Hunter, T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* **5**, 747-57 (1995).

Karpinich, N. O., Tafani, M., Rothman, R. J., Russo, M. A. & Farber, J. L. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* **277**, 16547-52 (2002).

Kolbus, A. et al. c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol Cell Biol* **20**, 575-82 (2000).

Koong, A. C. et al. Hypoxic activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2). *Cancer Res* **54**, 5273-9 (1994).

Koukourakis, M. I. et al. Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* **61**, 1830-2 (2001).

Koumenis, C. et al. Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol* **21**, 1297-310 (2001).

Kroemer, G. & Reed, J. C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**, 513-9 (2000).

Kumar, G. K. & Klein, J. B. Analysis of expression and posttranslational modification of proteins during hypoxia. *J Appl Physiol* **96**, 1178-86; discussion 1170-2 (2004).

Laderoute, K. R. et al. The response of c-jun/AP-1 to chronic hypoxia is hypoxia-inducible factor 1 alpha dependent. *Mol Cell Biol* **22**, 2515-23 (2002).

Leuenroth, S. J., Grutkoski, P. S., Ayala, A. & Simms, H. H. Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity. *Surgery* **128**, 171-7 (2000).

Loeffler, M. & Kroemer, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* **256**, 19-26 (2000).

Loh, C., Carew, J. A., Kim, J., Hogan, P. G. & Rao, A. T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1.

Mol Cell Biol **16**, 3945-54 (1996).

Lukiw, W. J. et al. Coordinate activation of HIF-1 and NF-kappaB DNA binding and COX-2 and VEGF expression in retinal cells by hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 4163-70 (2003).

Martinou, J. C., Desagher, S. & Antonsson, B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* **2**, E41-3 (2000).

Meresse, P., Dechaux, E., Monneret, C. & Bertounesque, E. Etoposide: discovery and medicinal chemistry. *Curr Med Chem* **11**, 2443-66 (2004).

Michel, G., Minet, E., Mottet, D., Remacle, J. & Michiels, C. Site-directed mutagenesis studies of the hypoxia-inducible factor-1alpha DNA-binding domain. *Biochim Biophys Acta* **1578**, 73-83 (2002).

Michiels, C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* **164**, 1875-82 (2004).

Minet, E. et al. c-JUN gene induction and AP-1 activity is regulated by a JNK-dependent pathway in hypoxic HepG2 cells. *Exp Cell Res* **265**, 114-24 (2001).

Mishra, O. P., Ashraf, Q. M. & Delivoria-Papadopoulos, M. Phosphorylation of cAMP response element binding (CREB) protein during hypoxia in cerebral cortex of newborn piglets and the effect of nitric oxide synthase inhibition. *Neuroscience* **115**, 985-91 (2002).

Nagarajah, N. S., Vigneswaran, N. & Zacharias, W. Hypoxia-mediated apoptosis in oral carcinoma cells occurs via two independent pathways. *Mol Cancer* **3**, 38 (2004).

Pei, L., Dodson, R., Schoderbek, W. E., Maurer, R. A. & Mayo, K. E. Regulation of the alpha inhibin gene by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate after transfection into rat granulosa cells. *Mol Endocrinol* **5**, 521-34 (1991).

Perez, C., Vilaboa, N. E. & Aller, P. Etoposide-induced differentiation of U937 promonocytic cells: AP-1-dependent gene expression and protein kinase C activation. *Cell Growth Differ* **5**, 949-55 (1994).

Piret, J. P. et al. Hypoxia and CoCl₂ protect HepG2 cells against serum deprivation- and t-BHP-induced apoptosis: a possible anti-apoptotic role for HIF-1. *Exp Cell Res* **295**, 340-9 (2004).

Piret, J. P. et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **280**, 9336-44 (2005).

Piret, J. P., Mottet, D., Raes, M. & Michiels, C. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci* **973**, 443-7 (2002a).

Piret, J. P., Mottet, D., Raes, M. & Michiels, C. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* **64**, 889-92 (2002b).

Poitras, E. & Houde, A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* **2**, 2-11 (2002).

Pradet-Balade, B., Boulmé, F., Beug, H., Mullner, E. & Garcia-Sanz, J. Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *TRENDS in Biochemical Sciences* **26**, 225-229 (2001).

Rich, T., Allen, R. L. & Wyllie, A. H. Defying death after DNA damage. *Nature* **407**, 777-83 (2000).

Risbud, M. V., Fertala, J., Vresilovic, E. J., Albert, T. J. & Shapiro, I. M. Nucleus pulposus cells upregulate PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways under hypoxic conditions and resist apoptosis induced by serum withdrawal. *Spine* **30**, 882-9 (2005).

Riva, C., Chauvin, C., Pison, C. & Leverve, X. Cellular physiology and molecular events in hypoxia-induced apoptosis. *Anticancer Res* **18**, 4729-36 (1998).

Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide. *J Biol Chem* **275**, 32438-43 (2000).

- Rupce, R. A. & Baeuerle, P. A. The genomic response of tumor cells to hypoxia and reoxygenation. Differential activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *Eur J Biochem* **234**, 632-40 (1995).
- Schmid, T., Zhou, J. & Brune, B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med* **8**, 423-31 (2004).
- Seko, Y., Takahashi, N., Tobe, K., Kadowaki, T. & Yazaki, Y. Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate p65PAK, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and stress-activated protein kinase (SAPK) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 840-4 (1997).
- Semenza, G. L. Perspectives on oxygen sensing. *Cell* **98**, 281-4 (1999).
- Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-32 (2003).
- Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-6 (2002).
- Shi, Q. et al. Cooperation between transcription factor AP-1 and NF-kappaB in the induction of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma cells by hypoxia. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 1363-71 (1999).
- Solary, E., Bettaieb, A., Dubrez-Daloz, L. & Garrido, C. Implications physiopathologiques des altérations des gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire. *Médecine/Sciences* **18**, 861-73 (2002).
- Stefanelli, C. et al. Caspase activation in etoposide-treated fibroblasts is correlated to ERK phosphorylation and both events are blocked by polyamine depletion. *FEBS Lett* **527**, 223-28 (2002).
- Sun, Y. Identification and characterization of genes responsive to apoptosis: application of DNA chip technology and mRNA differential display. *Histol Histopathol* **15**, 1271-84 (2000).
- Suzuki, H., Tomida, A. & Tsuruo, T. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* **20**, 5779-88 (2001).
- Tantini, B. et al. Polyamine depletion inhibits etoposide-induced NF-kappaB activation in transformed mouse fibroblasts. *Amino Acids* **27**, 207-14 (2004).
- Wang, Y., Rea, T., Bian, J., Gray, S. & Sun, Y. Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis: application of DNA chip technology. *FEBS Lett* **445**, 269-73 (1999).
- Weinmann, M., Belka, C. & Plasswilm, L. Tumour hypoxia: impact on biology, prognosis and treatment of solid malignant tumours. *Onkologie* **27**, 83-90 (2004).
- Wenger, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J* **16**, 1151-62 (2002).
- Wenger, R. H., Kvietikova, I., Rolfs, A., Gassmann, M. & Marti, H. H. Hypoxia-inducible factor-1 alpha is regulated at the post-mRNA level. *Kidney Int* **51**, 560-3 (1997).
- Yamauchi, T., Raffin, T. A., Yang, P. & Sikic, B. I. Differential protective effects of varying degrees of hypoxia on the cytotoxicities of etoposide and bleomycin. *Cancer Chemother Pharmacol* **19**, 282-6 (1987).
- Zampetaki, A., Mitsialis, S. A., Pfeilschifter, J. & Kourembanas, S. Hypoxia induces macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) gene expression in murine macrophages via NF-kappaB: the prominent role of p42/ p44 and PI3 kinase pathways. *Faseb J* **18**, 1090-2 (2004).
- Zimmermann, K. C., Bonzon, C. & Green, D. R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **92**, 57-70 (2001).

Sites internet

<http://www5.amershambiosciences.com>

<http://www.ich.ucl.ac.uk>

<http://www.cgmh.org.tw>

<http://www.activemotif.com>

<http://www1.qiagen.com>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>

<http://fbspcu01.leeds.ac.uk>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>

<http://linkage.rockefeller.edu/p53>

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html>

<http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/notes/Metabolisme.htm>

Annexe 1 : Liste des gènes détectables à l'aide de la DualChip™ human apoptosis

<u>Official symbol</u>	<u>Gene annotation</u>	<u>Gene</u>	<u>General function</u>	<u>Specific function/Remark</u>
ABL1	ABL1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	Cell cycle	Kinase activity
ADAM 17	ADAM 17	a disintegrin and metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	Cell migration	Metalloendopeptidase activity
AKT1	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Apoptosis	Receptor signaling protein serine/threonine kinase activity
AKT2	AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	Apoptosis	Receptor signaling protein serine/threonine kinase activity
BAD	BAD	BCL2-antagonist of cell death	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BAG1	BAG	BCL2-associated athanogene	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BAK 1	BAK 1	BCL2-antagonist/killer 1	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BAX	BAX	BCL2-associated X protein	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BCL2	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Apoptosis	Anti-apoptotic
BCL2A1	BCL2A1	BCL2-related protein A1	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
BclX	BclX	BCLX protein	Apoptosis	Induces or Inhibits apoptosis according to the alternative form
BID	BID	BH3 interacting domain death agonist	Apoptosis	Pro-apoptotic; Death receptor pathway
BIK	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	Apoptosis	Pro-apoptotic
BIRC2	BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2 (c-IAP1)	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
BIRC3	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3 (c-IAP2)	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
BIRC4	BIRC4	baculoviral IAP repeat-containing 4 (XIAP)	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
BIRC5	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
BNIP3	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	Apoptosis	Pro-apoptotic; Binds to the adenovirus E1B 19 kDa protein or to BCL-2
CASP1	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1 beta convertase)	Inflammation	Interleukin 1 beta convertase
CASP2	CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine protease	Apoptosis	Initiator caspase
CASP3	CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	Apoptosis	Effector caspase
CASP4	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	Apoptosis	Initiator caspase
CASP8	CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	Apoptosis	Initiator caspase
CCND1	cnd1	cyclinD1	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6
CCND2	cnd2	cyclinD2	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK7
CCNH	CCNH	cyclin H	Cell cycle	Phosphorylates and activates cyclin-dependant protein kinases

CDK2	CDK2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK25C	CDK25C	cell division cycle 25C	Cell cycle	Dephosphorylates CDC2
CDC6	CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	Cell cycle	DNA replication initiation
CDK2	CDK2	cyclin-dependent kinase 2	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK4	CDK4	cyclin-dependent kinase 4	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK5	CDK5	cyclin-dependent kinase 5	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK5R1	p35	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	Cell cycle	Activates the kinase
CDK6	cdk6	cyclin-dependent kinase 6	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK7	cdk7	cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK9	cdk9	cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDKN1A	p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes
CDKN1C	p57	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes
CDKN2A	p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Cell cycle	Inhibitor of CDK4
CDKN2B	p14-15	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)	Cell cycle	Inhibitor of CDK4
CFLAR	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (cFLIP)	Apoptosis	Adaptor, anti-apoptotic
CLK1	CLK1	CDC-like kinase 1	Cell cycle	Protein serine/threonine kinase activity
CLU	APOJ	ApolipoproteinJ (clusterin)	Stress response	Chaperone
CRADD	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	Apoptosis	Adaptor
CSE1L	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (CAS)	Cell proliferation	Intracellular protein transport
DDIT4L	REDD2	DNA damage response 2 (DDIT4L)		Unknown function
DFFA	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	Apoptosis	DNAse inducing inter-nucleosomal fragmentation
E2F1	E2F1	E2F transcription factor 1	Transcription	Transcription factor
E2F3	E2F3	E2F transcription factor 3	Transcription	Transcription factor
E2F5	E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	Transcription	Transcription factor
FADD	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Apoptosis	Adaptor
GADD45A	GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	Stress response	DNA damage repair
GAS1	GAS1	growth arrest-specific 1	DNA repair	Cell cycle arrest in G1
GPX1	GPX	glutathione peroxidase 1	Oxidative metabolism	Antioxidant enzyme
GRB2	GRB2	growth factor receptor-bound protein 2	Cell cycle	Adaptor for growth factor receptors
GSA	GSA	glutathione S-transferase A1	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
GSM	GSM	glutathione S-transferase M1	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
GSR	GSR	glutathione reductase	Drug metabolism	Glutathione reductase

GSTP1	GSTPi	Glutathione S-transferase pi	Drug metabolism	Glutathion (phase II)
GSTT1	GSTT1	Glutathione S-transferase theta1	Drug metabolism	Glutathion (phase II)
IGF1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Growth factor and cytokines	Growth factor
IGF1R	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	Cell signalling / receptor	Growth factor receptor
IGF2	IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	Growth factor and cytokines	Growth factor
IGF2R	IGF2R	insulin-like growth factor 2 receptor	Cell signalling / receptor	Growth factor receptor
IGFBP2	IGF2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	Cell proliferation	Growth factor modulation
IGFBP3	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	Cell proliferation	Growth factor modulation
IGFBP4	IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	Cell proliferation	Growth factor modulation
IGFBP5	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	Cell proliferation	Growth factor modulation
IGFBP6	IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6	Cell proliferation	Growth factor modulation
ING	ING1	inhibitor of growth family, member 1	Cell proliferation	Growth inhibitor
JUN	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	Transcription	Transcription factor subunit (AP-1)
LTA	TNFB	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	Growth factor and cytokines	Induction of apoptosis
LTB	LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	Growth factor and cytokines	Role in immune response
MAP2K1	MEK1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	Cell cycle	Protein dual kinase activity
MAP2K5	MAP2K5	mitogen-activated protein kinase kinase 5	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAP2K6	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAP3K14	MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAPK1	erk2	mitogen-activated protein kinase 1	Proliferation	Protein serine/threonine kinase activity
MAPK10	JNK3	mitogen-activated protein kinase 10	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAPK12	MAPK12	mitogen-activated protein kinase 12	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAPK14	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAPK3	erk1	mitogen-activated protein kinase 3	Proliferation	Protein serine/threonine kinase activity
MAPK7	erk5	mitogen-activated protein kinase 7	Proliferation	Protein serine/threonine kinase activity
MAPK8	JNK1	mitogen-activated protein kinase 8	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity , regulates c-jun
MAPK9	JNK2	mitogen-activated protein kinase 9	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity , regulates c-jun
MCL1	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	Apoptosis	Anti-apoptotic
MDM2	MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	Oncogenesis	Ubiquitin ligase for p53
MGST1	MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	Glutathione metabolism	Transferase activity

MYCN	MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (c-myc)	Transcription	Transcription factor
NFATC1	NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	Transcription	Transcription factor
NFKB1	NFKB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Transcription	Transcription factor
NOS2A	NOS2A	nitric oxide synthase 2A (inducible)	Electron transport	Nitric-oxide synthase activity
PCNA	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	Cell cycle	Increasing the polymerase's processibility
PDE1B	PDE1B	phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent	Apoptosis	Calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity
PLD1	PLD1	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	Phospholipid metabolism	Phospholipase D activity
PLK	PLK	polo-like kinase	Cell cycle	Phosphorylate cdc25A, initiating cell cycle
POR	POR	P450 (cytochrome) oxidoreductase	Electron transport	Oxidoreductase activity
RAF1	RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	Signal transduction	Kinase in growth factor-induced MAPK cascade
RARB	RARB	retinoic acid receptor, beta	Transcription	Receptor of retinoic acid, transcription factor
RB1	RB1	retinoblastoma 1 (pRB)	Cell cycle	Transcription repressor, binds E2F
RBL2	RB2	retinoblastoma-like 2 (p130)	Cell cycle	Negative regulation of cell cycle
RBP1	RBP1	retinoblastoma binding protein 1	Cell cycle	Transcription repressor
RIPK1	RIPK1	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
TANK	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	Signal transduction	Adaptor
TFDP1	DP1	transcription factor Dp-1	Transcription	Transcription factor ; Pol II transcription
TFDP2	DP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	Transcription	Transcription factor ; Pol II transcription
TNF	TNFA	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	Cytokine	Pro-apoptotic cytokine
TNFRSF10A	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily (TRAIL-R1)	Apoptosis	Receptor
TNFRSF10B	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily (TRAIL-R2)	Apoptosis	Receptor
TNFRSF1A	TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily (TNF-R1, p55)	Apoptosis	Receptor
TNFRSF1B	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily (TNF-RII, p80)	Apoptosis	Receptor
TNFRSF6	TNFRSF6	tumor necrosis factor receptor superfamily (FAS)	Apoptosis	Receptor
TNFSF10	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily (TRAIL)	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
TNFSF5	TNFSF5	tumor necrosis factor (ligand) superfamily (CD40 ligand)	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
TNFSF6	TNFSF6	tumor necrosis factor (ligand) superfamily (FAS ligand)	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
TNFSF7	TNFSF7	tumor necrosis factor (ligand) superfamily (CD27 ligand)	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
TP53	p53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	Transcription	Transcription factor

TP73	TP73	tumor protein p73	Transcription	Transcription factor
TRADD	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	Apoptosis	Adaptor
TRAF2	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	Signal transduction	Adaptor
TRAF3	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	Signal transduction	Adaptor
TRAF5	TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	Signal transduction	Adaptor
TRAF6	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	Signal transduction	Adaptor

Introduction

Matériel et méthodes

Résultats et discussion

Conclusion et perspectives

Bibliographie

Annexe

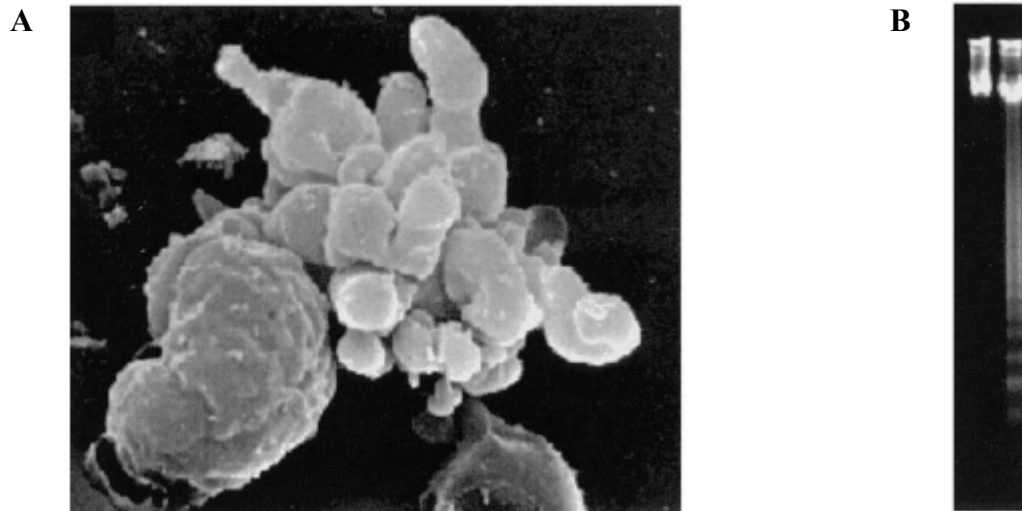


Figure I.1 : **A** : Morphologie d'une cellule en apoptose. **B** : Migration d'ADN sur gel d'agarose. Dans la colonne de droite, on peut observer la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN (« DNA ladder ») se produisant dans les cellules en apoptose. L'ADN de la colonne de gauche provient de cellules en bonne santé. (Zimmermann et al., 2001)

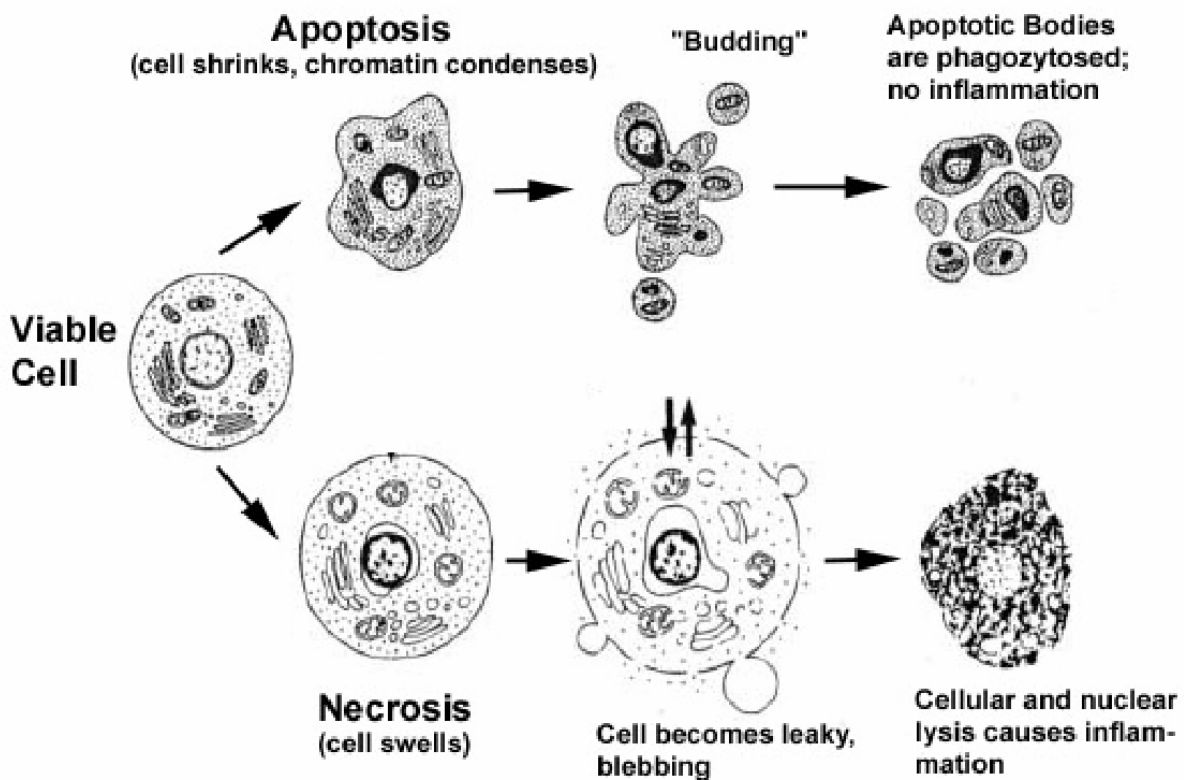


Figure I.2 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose. (Gewies, 2003)

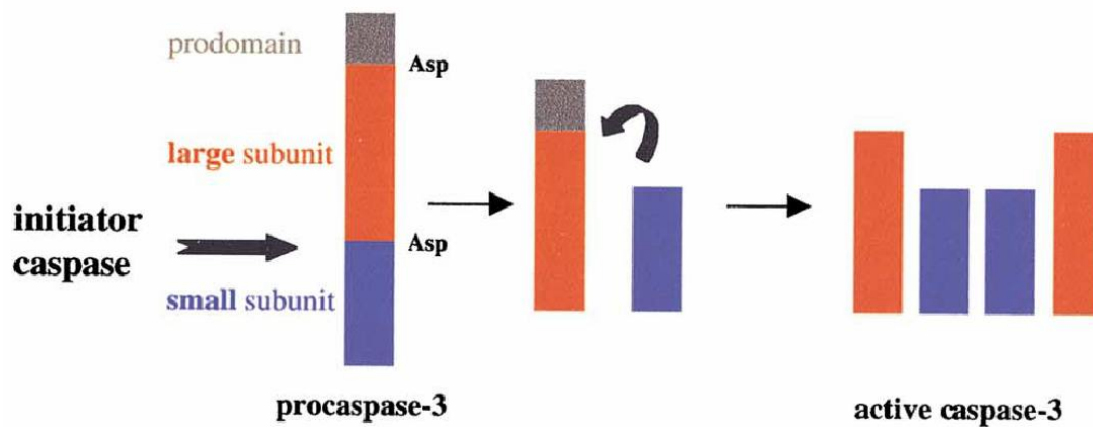
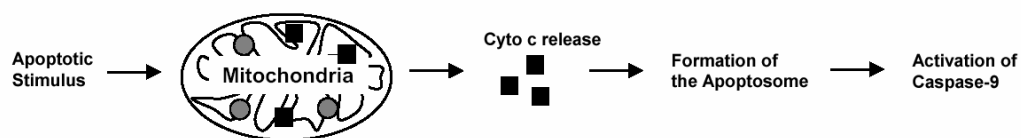


Figure I.3 : Représentation schématique de l'activation de la procaspase 3 par clivage. La caspase se trouve initialement sous forme d'un zymogène inactif qui est activé par deux clivages au niveau de liens Asp-X. Le premier entre la petite et la grande sous-unité et le second entre la grande sous-unité et le prodomaine. La caspase active est formée par l'association de deux hétérodimères comprenant chacun une petite et une grande sous-unités. (Zimmermann et al., 2001)

A. Mitochondrial pathway of caspase activation



B. Apoptosome formation and activation

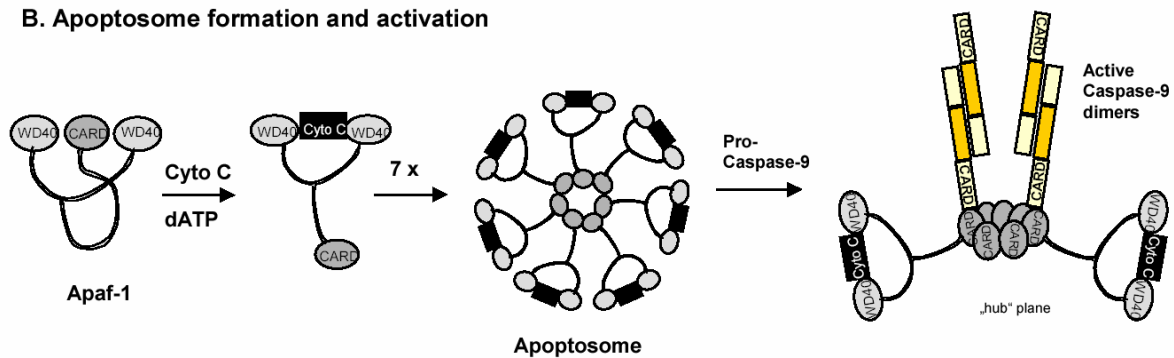


Figure I.4 : Activation des caspases en aval de la mitochondrie via la formation d'un apoptosome. La perception d'un stimulus apoptotique par une cellule peut provoquer une perméabilisation membranaire mitochondriale engendrant la libération du cytochrome c. Celui-ci va permettre la formation de l'apoptosome avec l'aide d'ATP. L'apoptosome est un complexe multi-protéique formé de 7 unités comportant chacune Apaf-1, une pro-caspase 9 et une molécule de cytochrome c. Au sein de cet apoptosome, les caspases 9 sont clivées et activées. (Gewies, 2003)

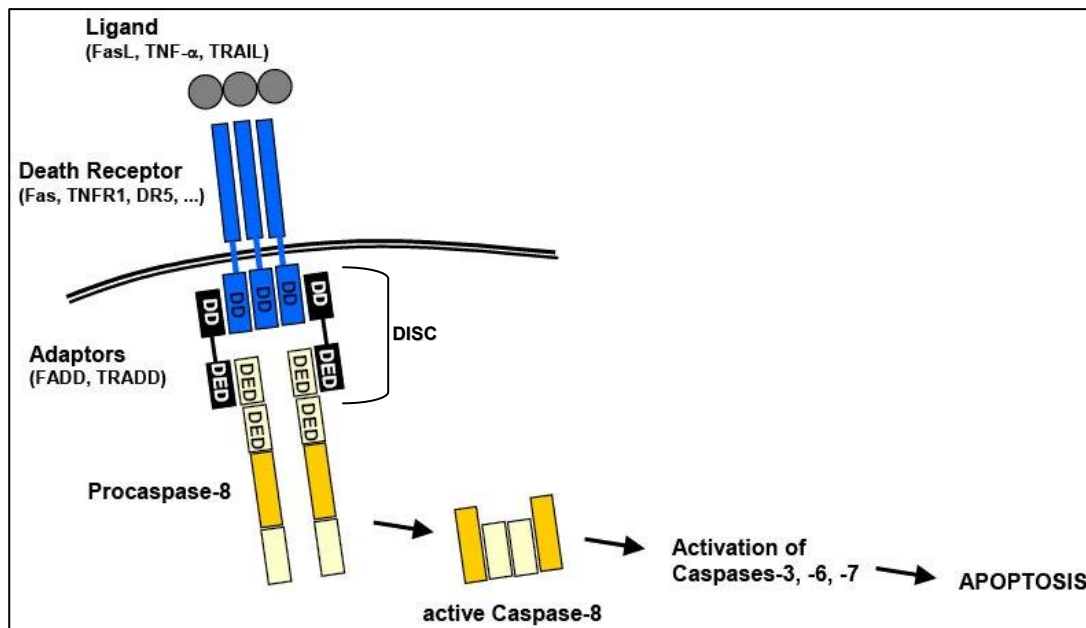


Figure I.5 : Activation de caspases médiée par un récepteur, au niveau du DISC. Lors de la liaison d'un ligand adapté sur un récepteur de la famille du TNF-R, une trimérisation a lieu. Des adaptateurs sont alors recrutés via les domaines de mort (DD). Ces adaptateurs possédant également des domaines effecteurs de mort (DED), ils interagissent avec des pro-caspases 8 qui vont ainsi être activées et activer à leur tour des caspases effectrices engendrant l'apoptose. (Gewies, 2003)

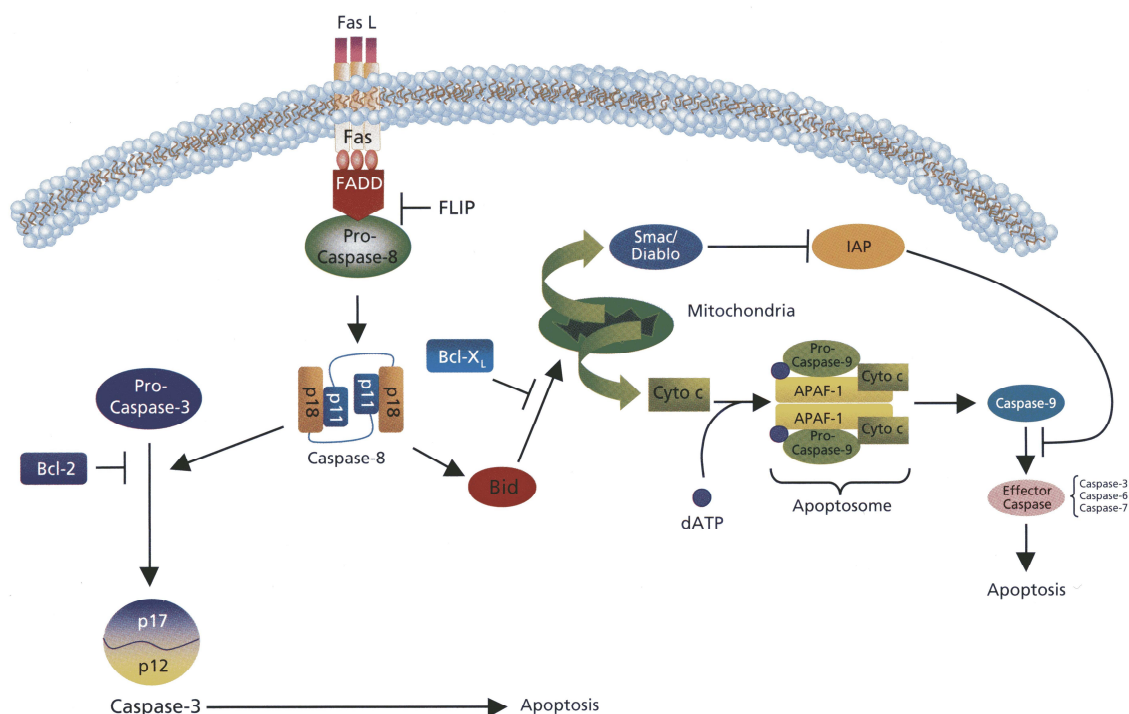


Figure I.6 : Voies apoptotiques initiées suite à la liaison de Fas L au récepteur Fas. Lors de la liaison de FasL au récepteur Fas, ce dernier interagit avec l'adaptateur FADD qui permet le recrutement et l'activation de la caspase 8. Celle-ci peut provoquer l'activation de la caspase 3 ainsi que le clivage de Bid. Bid tronqué transloque vers la mitochondrie où il va permettre la perméabilisation de la membrane mitochondriale, la libération du cytochrome c ainsi que d'autres protéines dont Smac/Diablo (un inhibiteur d'IAP), et la formation de l'apoptosome.

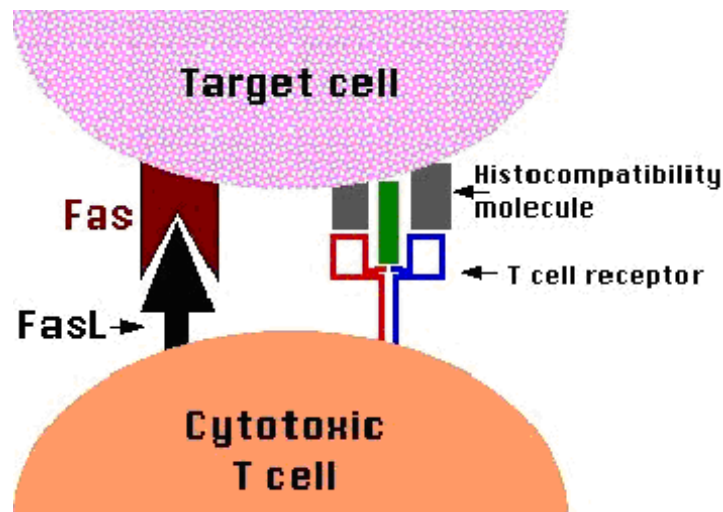


Figure I.7 : Reconnaissance par un lymphocyte T cytotoxique d'une cellule dont il va provoquer l'apoptose. Cette reconnaissance s'effectue via une molécule d'histocompatibilité reconnue par un récepteur du lymphocyte. L'apoptose va être induite via l'interaction entre le récepteur Fas de la cellule cible et le ligand FasL présent sur le lymphocyte. (<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html>)

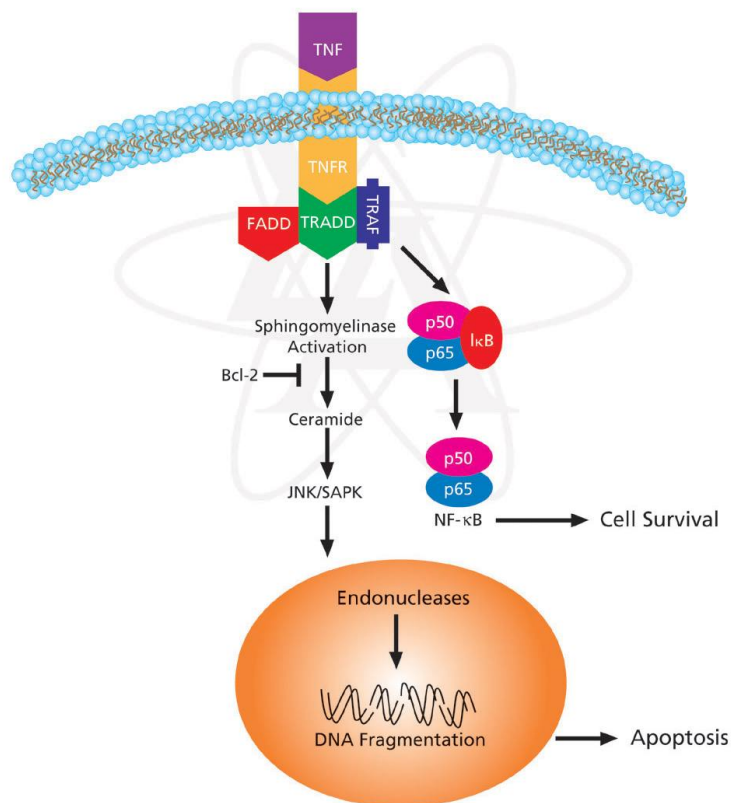


Figure I.8 : Voies de transduction initiées par la liaison du TNF au TNFR, menant soit à l'apoptose, soit à la survie cellulaire. Le TNFR, lorsqu'il lie du TNF, recrute l'adaptateur TRADD qui va lui-même recruter, soit FADD provoquant l'apoptose notamment via l'activation des voies de JNK/SAPK, ou bien TRAF, permettant, dans ce cas, l'activation du facteur de transcription NF-κB qui entraîne la survie cellulaire. (Sigma-Aldrich)

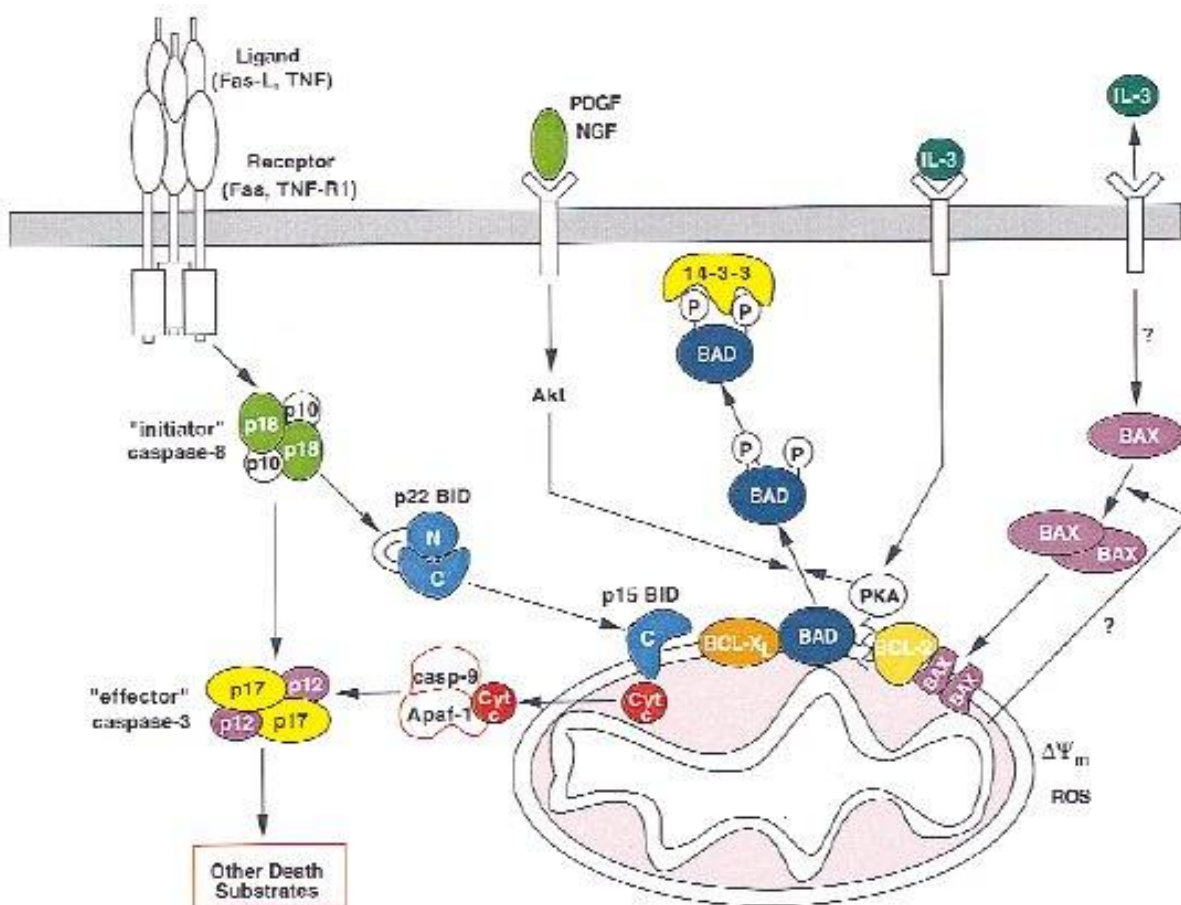


Figure I.9 : Voies d'initiation de l'apoptose médiée par la liaison d'un ligand sur un récepteur de la famille du TNF-R (à gauche) et par la privation en facteur de survie (à droite). Au centre est représentée une voie de survie activée en présence de certains facteurs de croissance. (Gross et al., 1999)

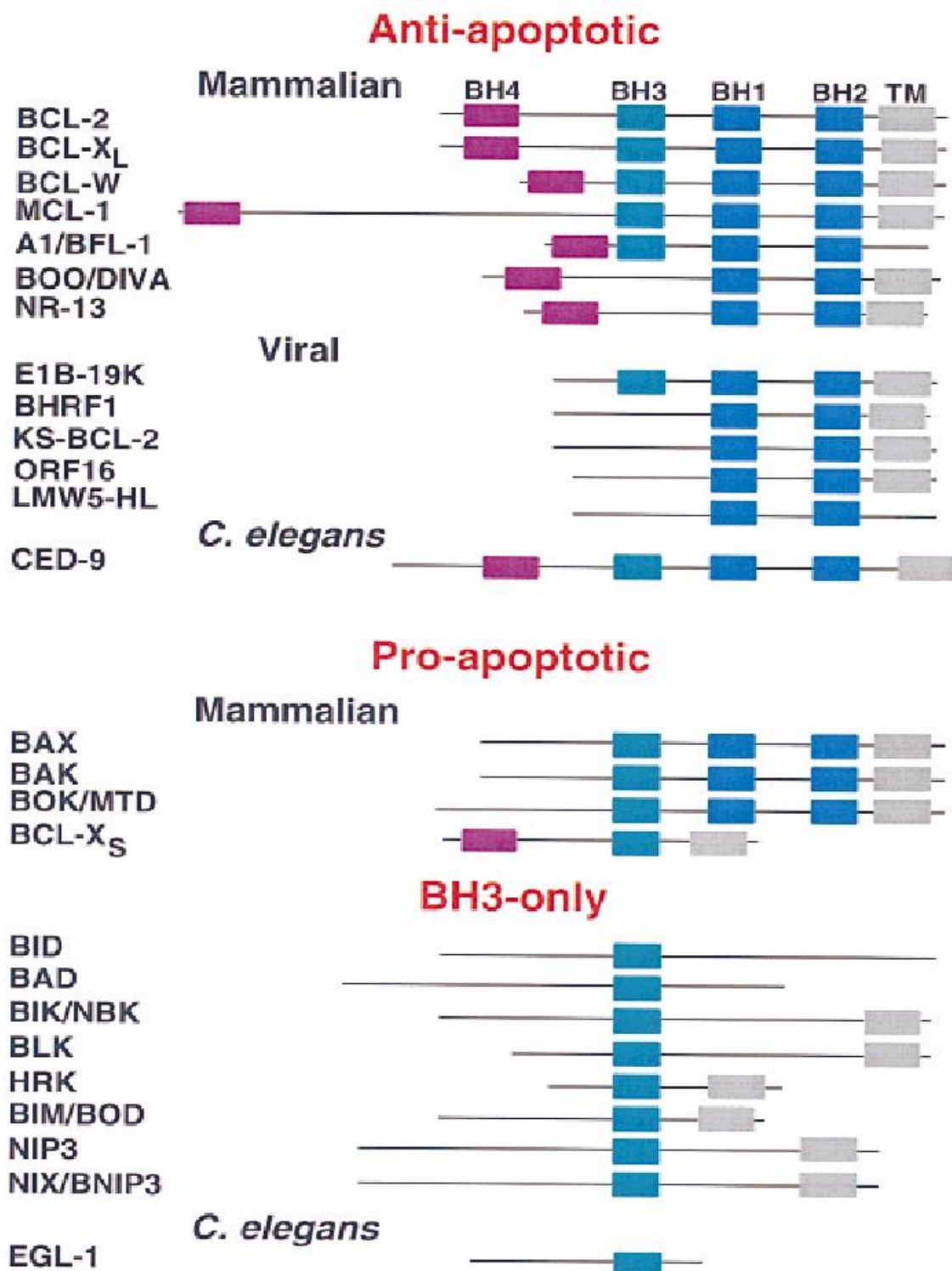


Figure I.10 : Présentation des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les domaines d'homologie Bcl-2 (BH1-4) sont indiqués, ainsi que les domaines hydrophobes carboxy-terminaux (TM). (Gross et al., 1999)

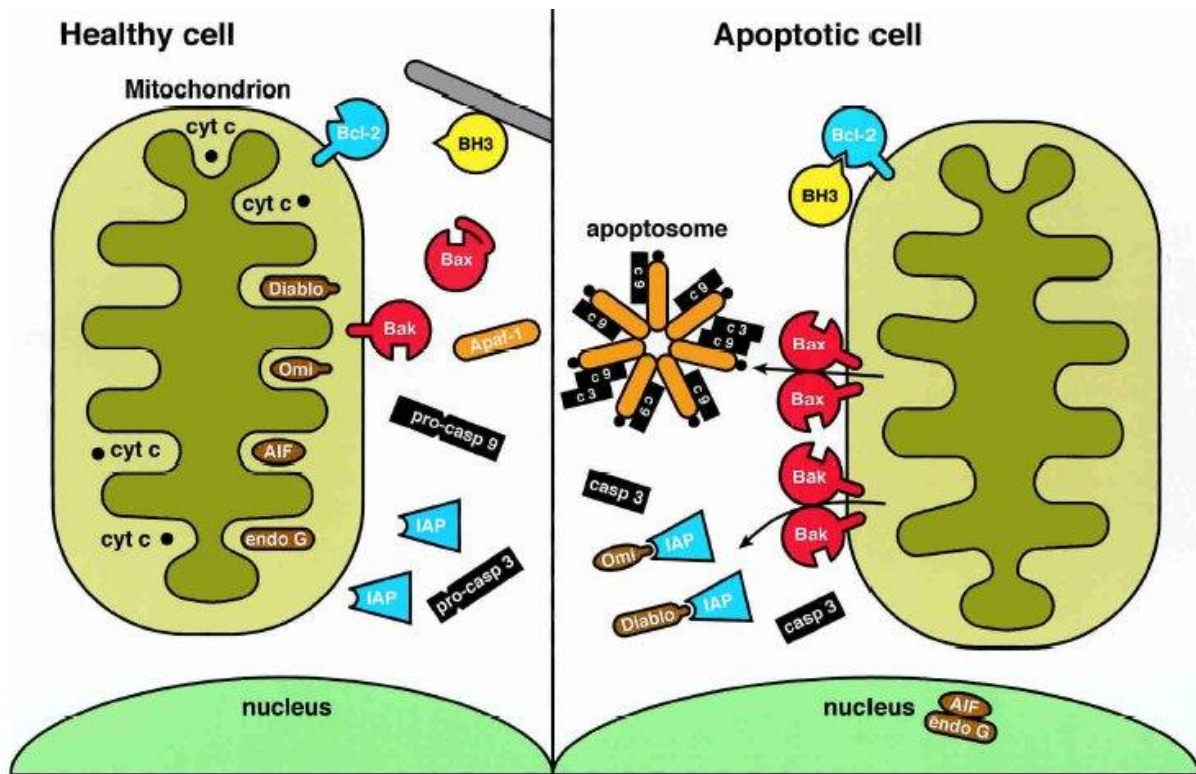


Figure I.11 : Rôle des protéines de la famille Bcl-2 et de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe dans l'apoptose. Dans une cellule en bonne santé, les caspases sont présentes sous forme de zymogènes et les protéines « BH3 only » sont séquestrées loin des protéines anti-apoptotiques. Lors de la réception d'un signal apoptotique, les protéines « BH3 only » libres s'associent avec Bcl-2 sur la mitochondrie, et le recrutement de Bax et Bak en oligomères sur la membrane mitochondriale externe mène à sa perméabilisation. Le cytochrome c libéré induit alors la formation de l'apoptosome heptamérique avec Apaf-1 et la procaspase 9, provoquant ainsi l'activation de la caspase 3. Les protéines Smac/Diablo et Omi/Htr2, libérées lors de la perméabilisation membranaire mitochondriale, inhibent les IAP alors que AIF et l'endonucléase G (endoG), également libérés lors de ce processus, pénètrent dans le noyau où ils aident à la dégradation de l'ADN. (Adams, 2003)

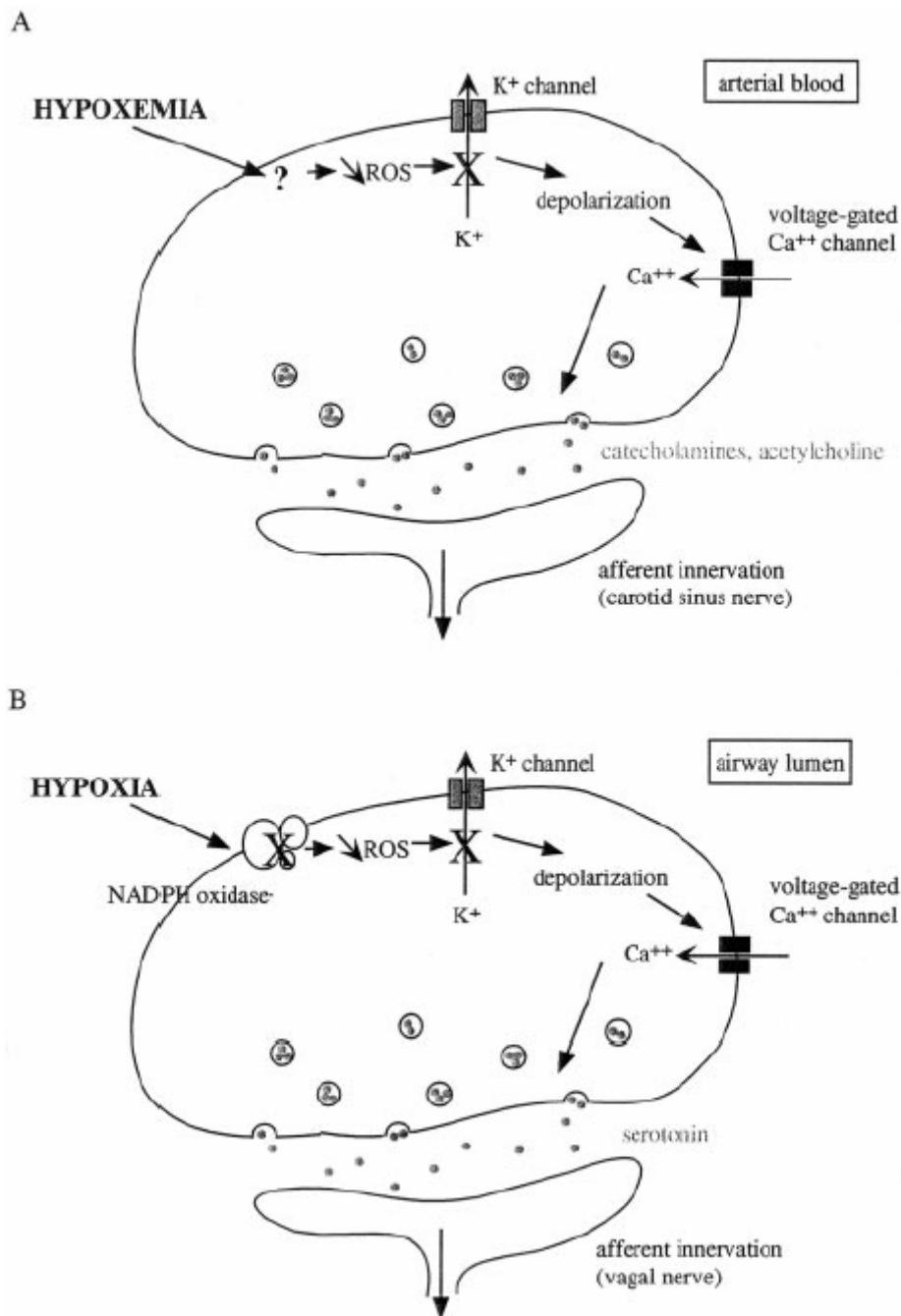


Figure I.13 : Représentation schématique de la réponse des corps carotidiens et neuroépithéliaux à l'hypoxie. Dans les deux cas, l'hypoxie provoque une diminution de la quantité de dérivés réactifs de l'oxygène. Ceci engendre une inhibition de canaux au potassium et donc une dépolarisation. Cette dépolarisation provoque une entrée de calcium par des canaux au Ca^{++} . Ce taux calcique cytosolique augmenté va alors provoquer la libération de neurotransmetteurs. **A :** corps carotidiens. **B :** corps neuroépithéliaux. (Michiels, 2004)

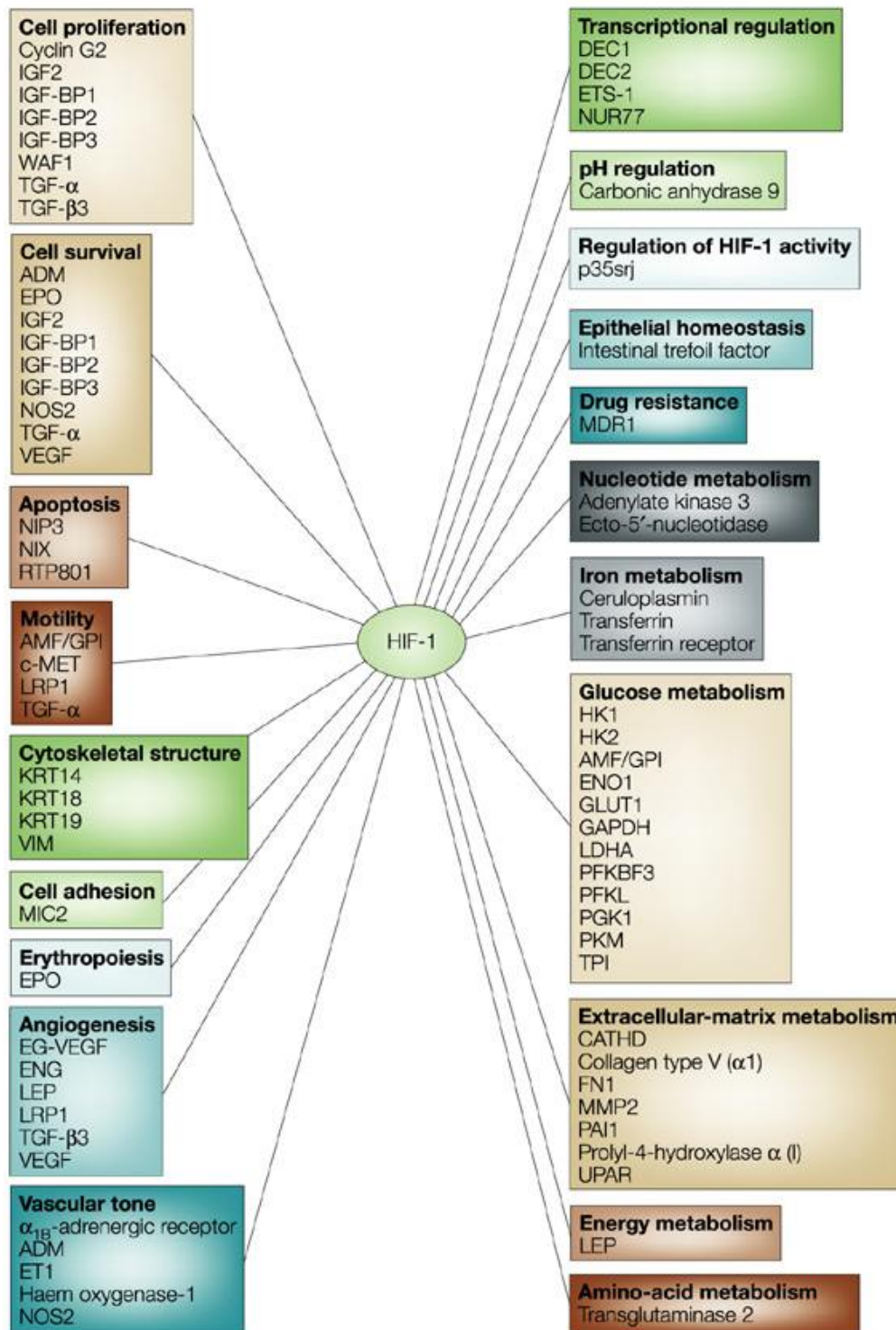


Figure I.14 : Liste non exhaustive de gènes activés transcriptionnellement par HIF-1. (Semenza, 2003)

ADM, adrenomedullin; ALDA, aldolase A; ALDC, aldolase C; AMF, autocrine motility factor; CATHD, cathepsin D; EG-VEGF, endocrinegland-derived VEGF; ENG, endoglin; ET1, endothelin-1; ENO1, enolase 1; EPO, erythropoietin; FN1, fibronectin 1; GLUT1, glucose transporter 1; GLUT3, glucose transporter 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase; HK1, hexokinase 1; HK2, hexokinase 2; IGF2, insulin-like growth-factor 2; IGF-BP1, IGF-factor-binding-protein 1; IGF-BP2, IGF-factor-binding-protein 2; IGF-BP3, IGF-factor-binding-protein 3; KRT14, keratin 14; KRT18, keratin 18; KRT19, keratin 19; LDHA, lactate dehydrogenase A; LEP, leptin; LRP1, LDL-receptor-related protein 1; MDR1, multidrug resistance 1; MMP2, matrix metalloproteinase 2; NOS2, nitric oxide synthase 2; PFKBF3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3; PFKL, phosphofructokinase L; PGK 1, phosphoglycerate kinase 1; PAI1, plasminogen-activator inhibitor 1; PKM, pyruvate kinase M; TGF- α , transforming growth factor α ; TGF- α 3, transforming growth factor α 3; TPI, triosephosphate isomerase; VEGF, vascular endothelial growth factor; UPAR, urokinase plasminogen activator receptor; VEGFR2, VEGF receptor-2; VIM, vimentin.

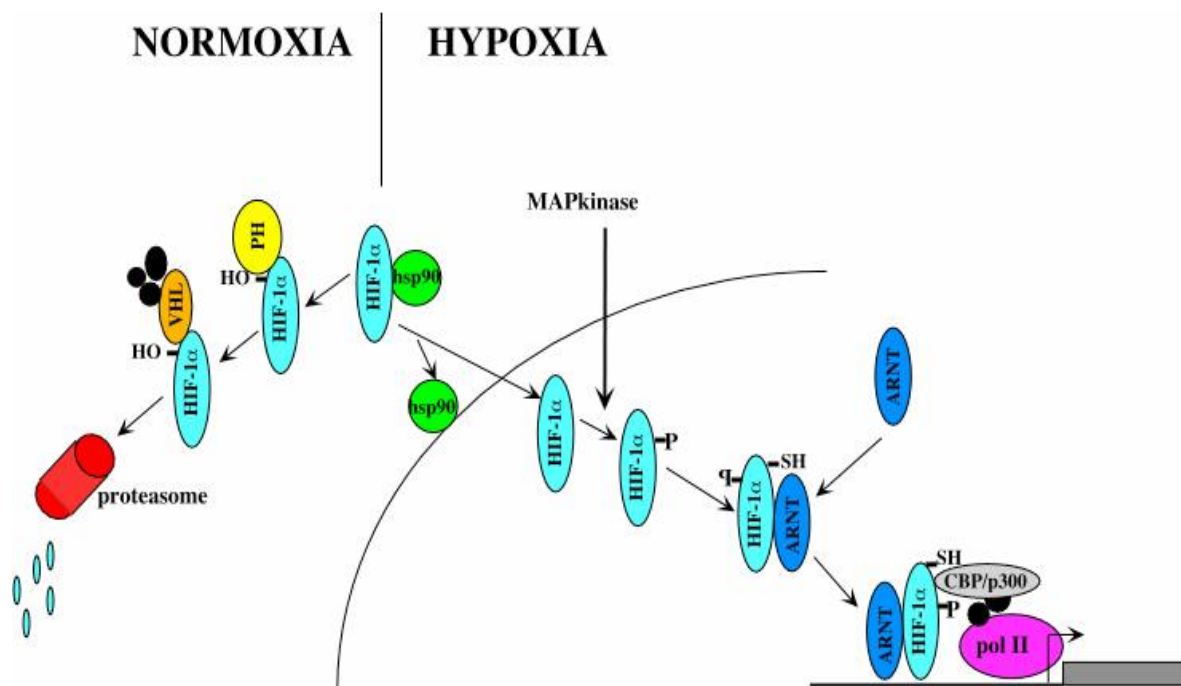


Figure I.15 : Représentation schématique de modifications post-traductionnelles impliquées dans la régulation de l'activité transactivatrice de HIF-1. En normoxie, cette sous-unité est hydroxylée sur des prolines, ce qui conduit à l'interaction avec la protéine de von Hippel-Lindau (pVHL) et d'autres protéines formant un complexe à activité ubiquitine ligase. Ce complexe va cibler HIF-1α vers une dégradation par le protéasome. En hypoxie, par contre, la protéine HIF-1α stabilisée se dissocie de la chaperone hsp90, transloque dans le noyau où elle est phosphorylée, et s'associe avec la sous-unité ARNT. L'hétérodimère interagit alors avec différents co-activateurs dont CBP/p300 pour activer la transcription de ses gènes cibles.

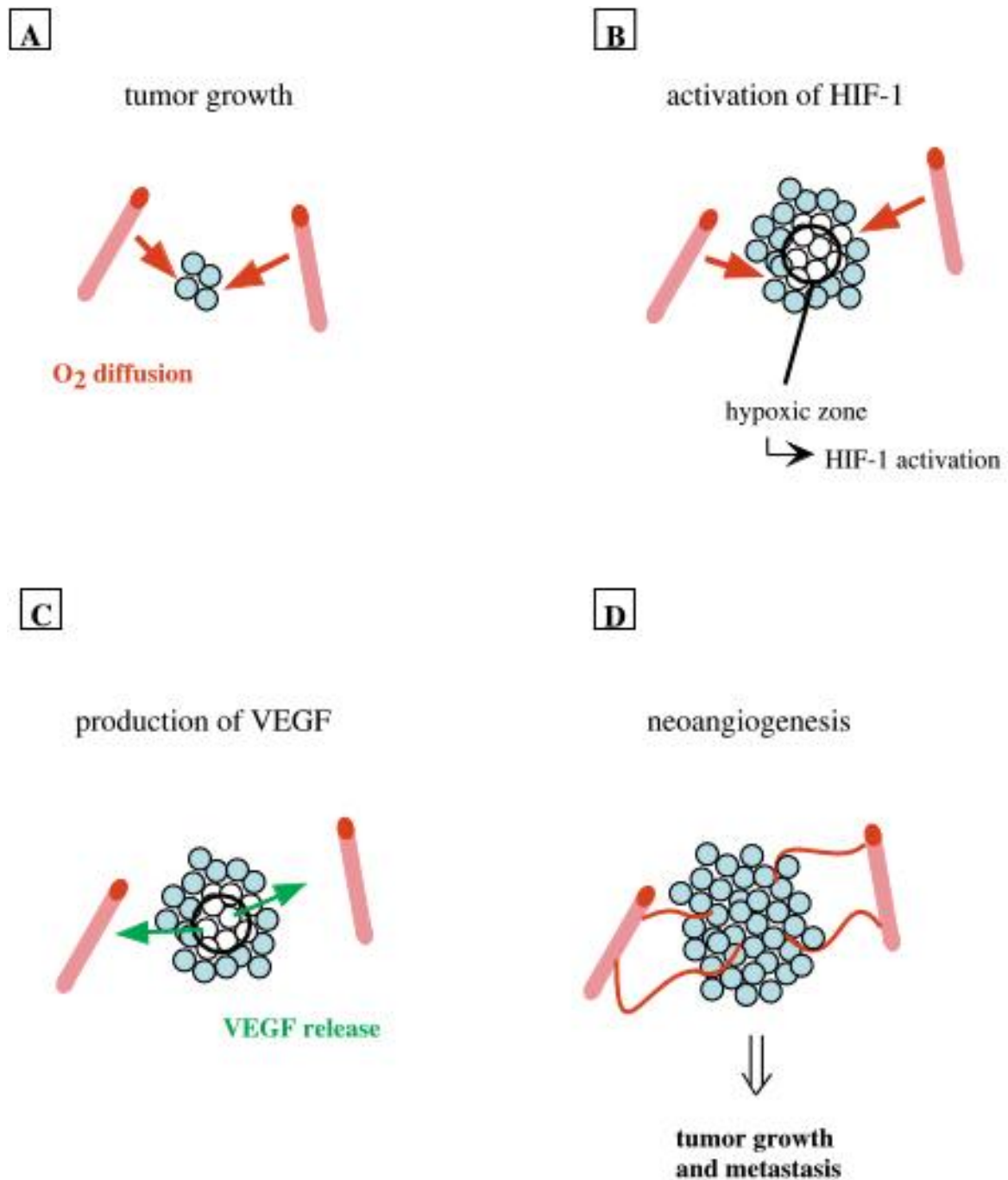


Figure I.16 : Représentation du développement d'une tumeur. Lorsque la tumeur grossit, une zone hypoxique se crée en son centre provoquant l'activation du facteur de transcription HIF-1. Ce facteur va entraîner la transcription du VEGF provoquant ainsi la néoangiogenèse. Les nouveaux vaisseaux sanguins vont permettre l'irrigation de la tumeur. Ceci a pour conséquence d'augmenter la croissance de la tumeur et de favoriser la formation de métastases. (Michiels, 2004)

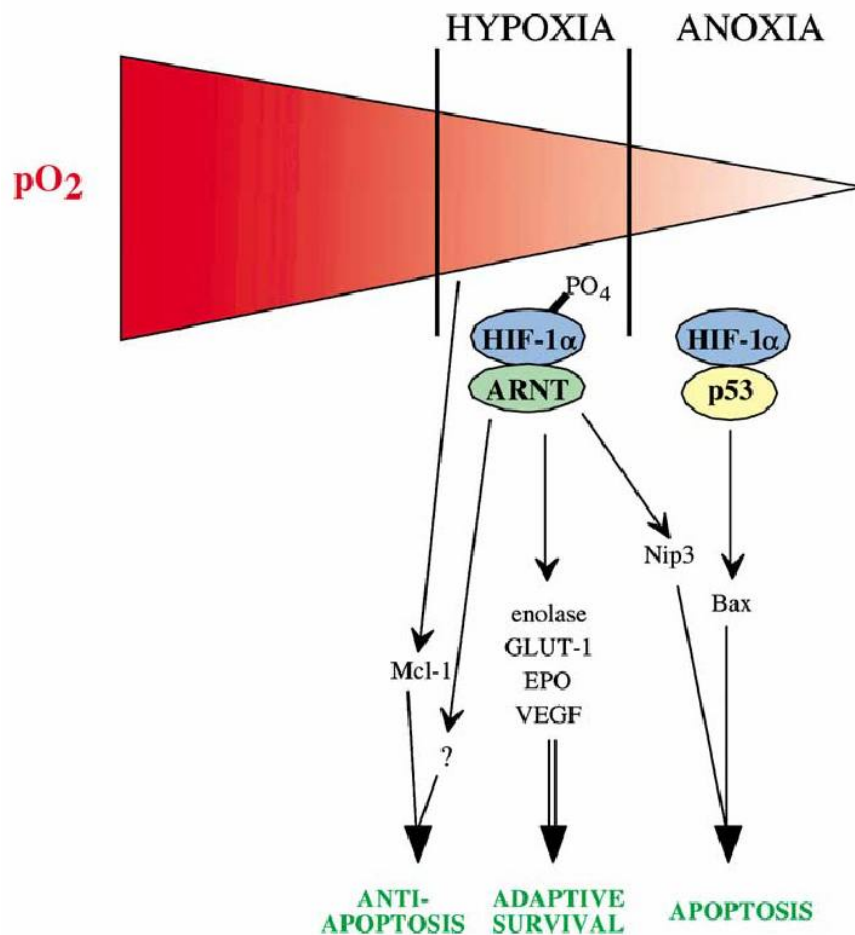


Figure I.17 : Représentation schématique des effets pro- et anti-apoptotiques de l'hypoxie. Lorsque les conditions hypoxiques ne sont pas trop sévères, la sous-unité HIF-1 α phosphorylée interagit avec ARNT. Cet hétérodimère va provoquer la transcription de ses gènes cibles dont certains ont un rôle anti-apoptotiques (comme Mcl-1), d'autres favorisent l'adaptation de la cellule à la situation hypoxique (énolase, GLUT-1, EPO, VEGF), alors que d'autres sont pro-apoptotiques (Nip3). En condition d'hypoxie sévère et/ou prolongée (anoxie), p53, qui interagit avec HIF-1 α , peut transactiver ses gènes cibles dont certains, comme Bax, ont un rôle pro-apoptotique. (Piret et al., 2002)

	CREB	API	p53	Elk-1	NF-κB
Tampon de binding concentré	Concentré 10X : Tris. HCl 100 mM, MgCl ₂ 10 mM, EDTA 5 mM, NaCl 500 mM, Glycérol 40 %, H ₂ O, pH 7,5	Concentré 3X : Hepes 6 mM pH 7,9, EDTA 0,6 mM, NaCl 24 mM, Glycérol 36 %, H ₂ O, pH 7,9	Concentré 2X : Tris. HCl 40 mM, MgCl ₂ 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 100 mM, Glycérol 20 %, H ₂ O, pH 7,5	Concentré 1X : Hepes 2 mM, EDTA 0,2 mM, NaCl 8 mM, Glycérol 12 %, H ₂ O, pH 7,5	Concentré 1X : Hepes 10 mM, KCl 300 mM, Glycérol 20 %, H ₂ O, pH 7,5
Tampon de binding complet 1 x	400 µl tampon de binding 10 x concentré, 4 µl DTT 1 M, 6,7 µl DSS 10 mg/ml, 3328 µl H ₂ O → 30 µl/puits	400 µl tampon de binding 3 x concentré, 1,2 µl DTT 1 M, 1,3 µl polydIC 150 ng/µl, 12 µl de Gloria 10 %, 800 µl H ₂ O → 30 µl/puits	1 ml tampon de binding 2 x concentré, 2 µl DTT 1 M, 20 µl polydIC 150 ng/µl, 988 µl H ₂ O → 40 µl/puits	1 ml tampon de binding 1 x concentré, 2,5 µl DTT 1 M → 30 µl/puits	1 ml tampon de binding 1 x concentré, 500 µl BSA 5 %, 5 µl DTT 1 M, 2,5 µl DSS 10 mg/ml, 1 ml H ₂ O → 30 µl/puits
Tampon de lyse	1 ml tampon RE, 1 ml tampon SA, 80 µl PIC, 80 µl PIB, 2 µl DTT 1 M			900 µl tampon RE, 100 µl tampon SA, 40 µl PIC, 40 µl PIB	2 ml de tampon de lyse stock**, 10 µl DTT 1 M, 80 µl PIC
Concentration protéique	5 µg / 20 µl			10 µg / 20 µl	5 µg / 20 µl
Solution de lavage	PBS, Tween 20 0,1 %, BSA 1 %	PBS50*, Tween 20 0,1 %			
Dilution de l'anticorps primaire	anticorps de chèvre anti-phospho-CREB (sc-7978) dilué 500 x dans PBS + BSA 5 %	anticorps de lapin anti-c-fos (sc-7202) OU anti-c-jun (sc-1694) dilué 1000 x dans du PBS50* + BSA 1 %	anticorps de lapin anti-p53 (sc-6243), dilué 1000 x dans du PBS50* + BSA 5 %	anticorps de souris anti-phospho-elk-1 (sc-8406) dilué 500 x dans du PBS50* + BSA 1 %	anticorps de lapin anti-p-50 (sc-3176) dilué 1000 x dans du PBS50* + BSA 1 %
Dilution de l'anticorps secondaire	anti-IgG de chèvre couplé à la peroxydase dilué 1000 x dans du PBS + gloria 1 %	anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase dilué 1000 x dans du PBS50* + BSA 1 %	anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase dilué 1000 x dans du PBS50* + gloria 1 %	anti-IgG de souris couplé à la peroxydase dilué 1000 x dans du PBS50* + gloria 1 %	anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase dilué 1000 x dans du PBS50* + gloria 1 %

*PBS 50 : solution saline avec NaCl 50 mM, phosphate 10 mM, pH 7,5

**Tampon de lyse stock pour NF-κB : Hepes 20 mM, NaCl 350 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,1 mM, Glycérol 20 %, NP-40 1 %, pH 7,5

Tableau II.13 : Différentes solutions et concentrations utilisées lors des dosages Trans-AM.

PBS (phosphate buffer saline)	tampon phosphate 10 mM NaCl 150 mM pH 7,4
-------------------------------	---

Tableau II.1 : Composition du PBS.

$$\frac{(\text{Abs}_{\text{échantillon}} - \text{Abs}_{\text{blanc échantillon}})}{(\text{Abs}_{\text{étalon}} - \text{Abs}_{\text{eau}})} \times \frac{5}{\text{Vol}_{\text{échantillon}}} = \mu\text{g de protéines} / \mu\text{l}$$

Tableau II.2 : Formule permettant d'évaluer la concentration protéique d'un échantillon par la méthode de Bradford.

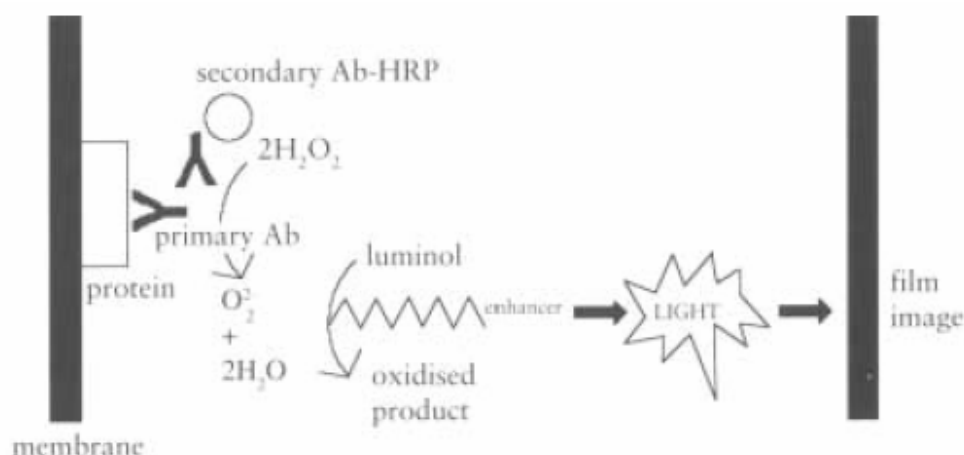


Figure II.18 : Illustration du principe du Western Blot. Les protéines adsorbées sur la membrane sont reconnues par un anticorps primaire lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à la HRP. En présence d' H_2O_2 et de luminol, cette enzyme permet la production de photons qui sont détectés grâce à un film autoradiographique. (<http://www5.amershambiosciences.com>)

Tampon de lyse	1 ml de tampon de lyse stock 2 x 580 μl eau 20 μl Triton-X100 (Sigma, USA) 200 μl de PIC 200 μl de PIB
Tampon de lyse stock 2 x	40 mM Tris (Merck, Germany) 300 mM KCl (Merck, Germany) 2 mM EDTA (Merck, Germany) pH 7,5
PIB (phosphatase inhibitor cocktail)	Na_3VO_4 25 mM (Sigma, USA) PNPP (para-nitrophényl phosphate) 250 mM (Sigma, USA) β -glycérophosphate 250 mM (Sigma, USA) NaF 125 mM (Merck, Germany)
PIC (protease inhibitor cocktail)	Une tablette diluée dans 2 ml d'eau. (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25 x, Roche, Germany)

Tableau II.3 : Composition du tampon de lyse utilisé pour l'extraction totale de protéines ainsi que celle des solutions utilisées pour le préparer.

Gel Buffer	pour 200 ml : 36,3 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 0,8 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) pH 8,9
Gel mix pour gel 12 %	8,4 ml de gel buffer 14 ml d'acryl/bis (30/0,8) (Bio-Rad, USA) 12,6 ml d'H ₂ O
Gel mix pour gel 15 %	8,4 ml de gel buffer 17,5 ml d'acryl/bis (30/0,8) (Bio-Rad, USA) 9,1 ml d'H ₂ O
Gel séparateur	35 ml de gel mix 175 µl d'APS (Pharmacia Biotech AB, Swedish) 25 % 10,5 µl de TEMED (Pharmacia Biotech AB, Swedish)
Spacer gel buffer	pour 100 ml : 5,1 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 0,4 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) pH 6,8
Spacer gel mix	2,5 ml de spacer gel buffer 1,7 ml d'acryl/bis (30/0,8) (Bio-Rad, USA) 5,8 ml d'H ₂ O
Gel concentrateur	10 ml de spacer gel mix 50 µl d'APS (Pharmacia Biotech AB, Swedish) 25 % 3 µl de TEMED (Pharmacia Biotech AB, Swedish)
Bleu de charge 5 x (tampon d'échantillon)	10 ml de spacer gel buffer 10 ml de SDS (ICN Biomedicals, USA) 20 % 5 ml de β-mercaptoéthanol (Flukachemie AG, Swiss) 10 ml de glycérol (Merck, Germany) 17,5 mg bleu de bromophénol (Janssen Chimica, Belgium)
Running buffer 10 x	pour 1 l : 63,2 g de Tris (ICN Biomedicals, USA) 40 g de glycine (ICN Biomedicals, USA) 10 g de SDS (ICN Biomedicals, USA)
Blotting buffer (tampon de transfert) (utilisation 3 x)	pour 5 l : 24 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 115 g de glycine (ICN Biomedicals, USA) 1 l de méthanol (Merck, Germany)
TBS 10 x	Pour 1 l : 24,22 g de Tris (Merck, Germany) 80,06 g de NaCl (Merck, Germany) pH 7,6
TBS-T 0,1 %	100 ml de TBS 10 x 900 ml d'H ₂ O 1 ml de Tween 20 (Sigma, USA)
TBS-T-lait	TBS-T 0,1 % + 2 % blocking agent (Amersham CPK1075, USA)

Tableau II.4 : Composition des différentes solutions utilisées pour l'électrophorèse Tris-Glycine, pour le transfert des protéines du gel sur la membrane ainsi que pour le blocage et les dilutions d'anticorps.

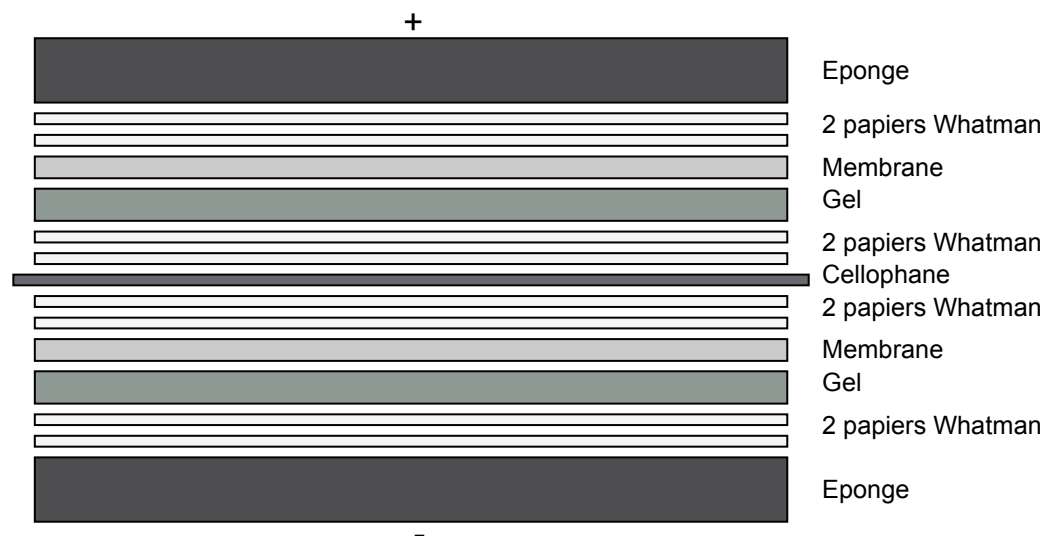


Figure II.19 : Représentation des différentes couches du sandwich réalisé pour le transfert des protéines du gel d'électrophorèse sur la membrane.

Protéine contre laquelle l'anticorps est dirigé	Référence de l'anticorps	Espèce dans laquelle les anticorps ont été produits	Dilution effectuée
Bak	# 3792 (Cell Signalling Technologies)	Lapin	1/10000
Mdm2	556353 (BD Biosciences)	Souris	1/5000
p21	Sc-397 (Santa Cruz)	Lapin	1/10000
c-jun	Sc-1694 (Santa Cruz)	Lapin	1/10000
p53	N°610958 (Upstate Biotechnology, USA)	Souris	1/10000
α -tubuline	T5168 (Sigma, USA)	Souris	1/37500
PARP	N° 556493 (PharMingen, USA)	Souris	1/5000
c-fos	Sc-7202 (Santa Cruz)	Lapin	1/10000

Tableau II.5 : Indications concernant les anticorps primaires utilisés en Western Blot.

Nom de l'anticorps	Fournisseur	Dilution effectuée
anti-Ig de lapin couplé à la HRP	Amersham Bioscience, USA	1/50000
anti-Ig de souris couplé à la HRP	Amersham Bioscience, USA	1/50000
anti-Ig de souris couplé à la HRP lors de la révélation de l' α -tubuline	Amersham Bioscience, USA	1/200000

Tableau II.6 : Indications concernant les anticorps secondaires utilisés en Western Blot.

PBS/BSA	2 g de BSA (Sigma, USA) par 100 ml de PBS
PBS/Triton	PBS + 1 % de Triton X-100 (Sigma, USA)
Mowiol	0,1 g de Mowiol (Sigma-Aldrich, Germany-UK) par ml d'un tampon Tris 1,5 M, pH 8,8, contenant 22 % de glycérol

Tableau II.7 : Composition des solutions utilisées lors d'une immunofluorescence.

Protéine contre laquelle l'anticorps est dirigé	Référence de l'anticorps	Espèce dans laquelle les anticorps ont été produits
Caspase 3 active	N°G7481 (Promega, USA)	Lapin
c-fos	Sc-052 (Santa Cruz)	Lapin
c-jun	Sc-1694 (Santa Cruz)	Lapin
HIF-1 α	BD-610958 (BD Biosciences)	Souris
p65 de NF- κ B	Sc-372 (Santa Cruz)	Lapin
Phospho-ATF2	Sc-8398 (Santa Cruz)	Souris
Phospho-CREB	# 06-519 (Upstate Biotechnology)	Lapin
Phospho-elk1	Sc-8404 (Santa Cruz)	Souris
STAT-1 α	Sc-345 (Santa Cruz)	Lapin

Tableau II.8 : Indications concernant les anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.

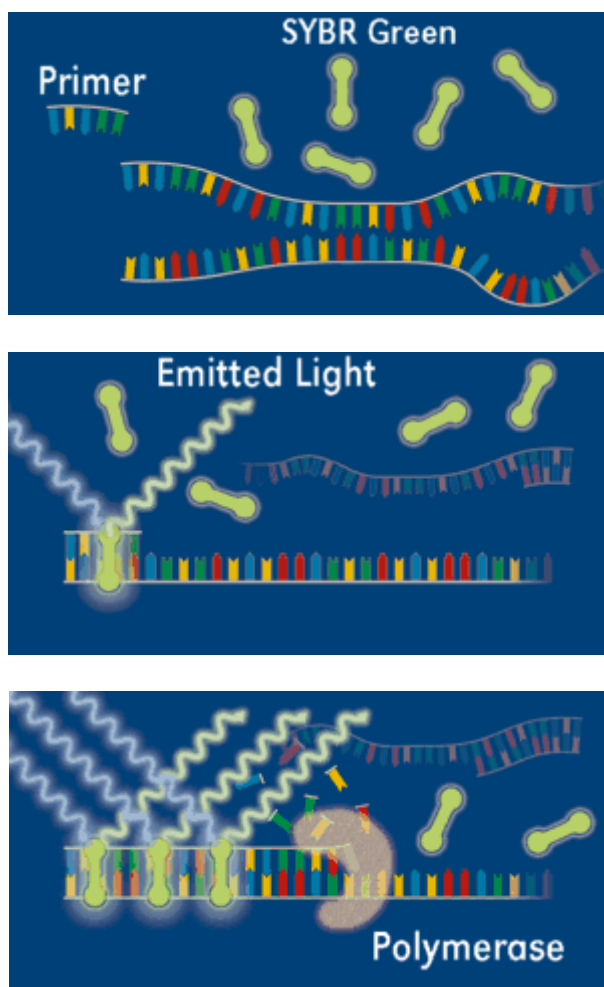
Anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 488 nm (495 nm / 519 nm) (Molecular Probes, USA)
Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa 488 nm (495 nm / 519 nm) (Molecular Probes, USA)

Tableau II.9 : Anticorps secondaires utilisés lors des marquages en immunofluorescence.

Reaction mix	4 µl de Buffer RT 5 X (Invitrogen) 2 µl de DTT 0,1 M (Invitrogen) 1 µl de RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl ; Promega, USA) 2 µl de dNTP mix (Eurogentech, Belgique)
--------------	--

Tableau II.10 : Composition du mix de réaction utilisé pour la rétrotranscription préalable à la real-time PCR.

A.



B.



Figure II.20 : Principe d'action du SYBR Green. **A.** Au début de l'amplification, les molécules de SYBR Green sont en solution et émettent très peu de fluorescence. Lors de l'hybridation des amorces sur l'ADN matrice, quelques molécules de sondes peuvent se lier à cet ADN double brin, ce qui provoque une augmentation d'émission de fluorescence. Pendant l'élongation, un nombre croissant de molécules de SYBR Green peuvent se fixer, engendrant une fluorescence de plus en plus grande qui peut être suivie en temps réel. (<http://www.ich.ucl.ac.uk/>) **B.** Illustration de la liaison du SYBR Green dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN. (<http://www.cgmh.org.tw>)

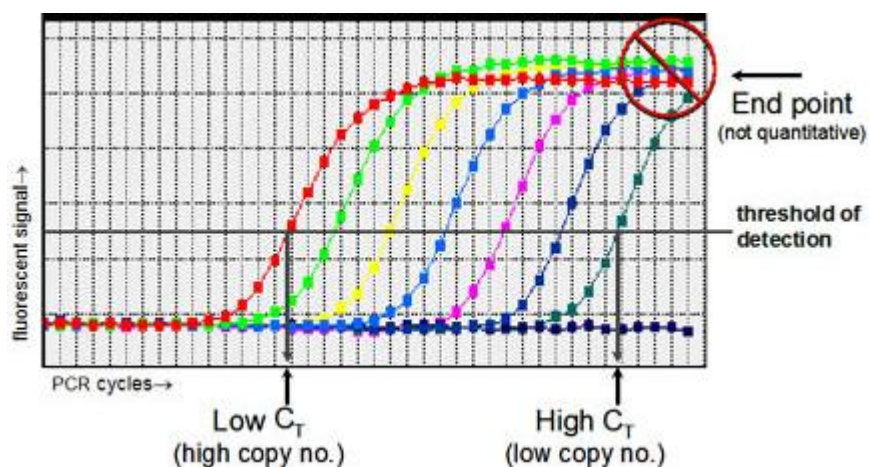


Figure II.21 : Courbes d'amplification théoriques obtenues par PCR en temps réel montrant l'évolution de l'intensité de fluorescence émise par le SYBR Green en fonction du nombre de cycles PCR. Le seuil de détection (threshold) est le niveau auquel l'intensité du signal fluorescent est significativement supérieure au bruit de fond. Le cycle auquel l'échantillon atteint ce seuil est appelé le cycle seuil (C_t). Plus le C_t est élevé, plus le nombre de copies de la séquence d'ADN à amplifier, présent au début de la réaction, est faible. Ce C_t se trouve toujours dans la phase exponentielle. En effet, lorsque le plateau est atteint, les résultats ne sont plus quantitatifs. (D'après <http://www.cgmh.org.tw>)

Mix PCR	4,2 μl d' H_2O RNase-free (Promega, USA) 1,7 μl d'amorce sens (Applied Biosystems, Holland) 1,7 μl d'amorce anti-sens (Applied Biosystems, Holland) 12,5 μl de Master mix SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Holland)
---------	---

Tableau II.11 : Composition du mix PCR.

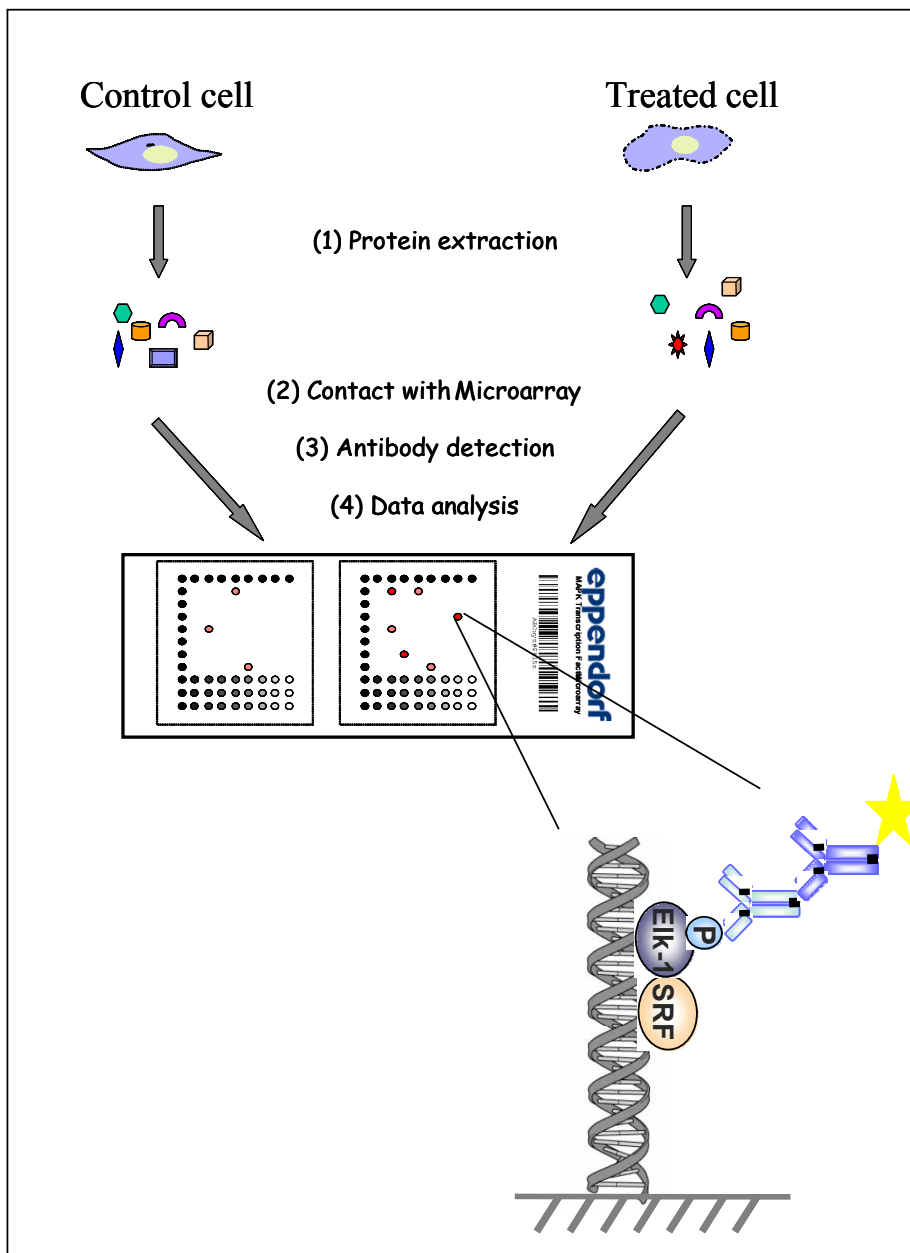


Figure II.23 : Principe général de la TFChipMAPK. Les échantillons obtenus par extraction nucléaire pour différentes conditions sont mis en contact avec les microdamiers. Les facteurs de transcription activés qui se lient à leur séquence consensus sur l'ADN fixé sur le damier sont reconnus par des anticorps primaires spécifiques. Le cas de Elk-1 est illustré sur cette figure. L'anticorps primaire est alors reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome permettant la détection. La lame est alors scannée et les spots obtenus sont quantifiés et analysés.

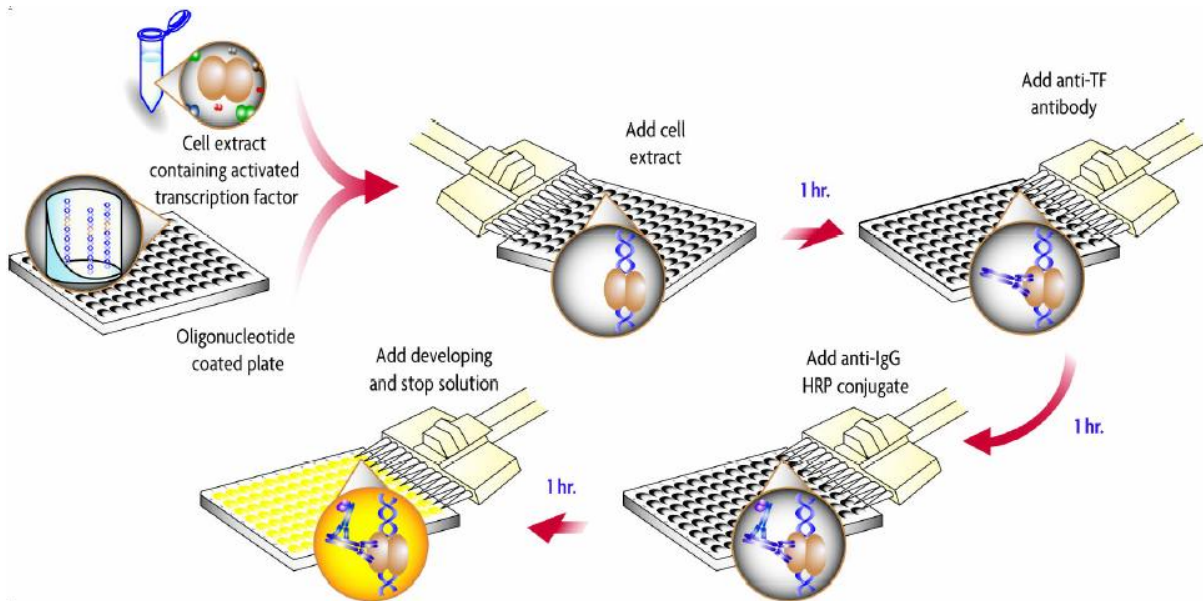


Figure II.24 : Principe du dosage Trans-AM. Des extraits nucléaires contenant le facteur de transcription à détecter sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits contenant des oligonucléotides possédant le site consensus reconnu par ce facteur de transcription. Des anticorps primaires dirigés contre ce facteur de transcription sont ensuite placés, puis reconnus par des anticorps secondaires anti-IgG couplés à la peroxydase HRP. Après l'ajout d'une solution de révélation et d'une solution stop, la réaction colorimétrique est détectée. (www.activemotif.com)

A.



B.

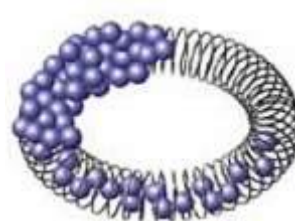


Figure II.25 : Représentation schématique du SuperFect. **A.** Le SuperFect est un dendrimère polycationique possédant une architecture sphérique. Des branches partent du centre et se terminent par des groupements amines qui peuvent interagir avec les groupements phosphates de l'ADN. **B.** Lorsque le SuperFect lie l'ADN, il lui donne une structure compacte qui peut se lier à la surface cellulaire et pénétrer dans la cellule par endocytose non-spécifique. De plus, ce réactif tamponne le pH menant à une inhibition des nucléases de l'endosome, ce qui assure la stabilité du complexe SuperFect-ADN. (<http://www1.qiagen.com>)

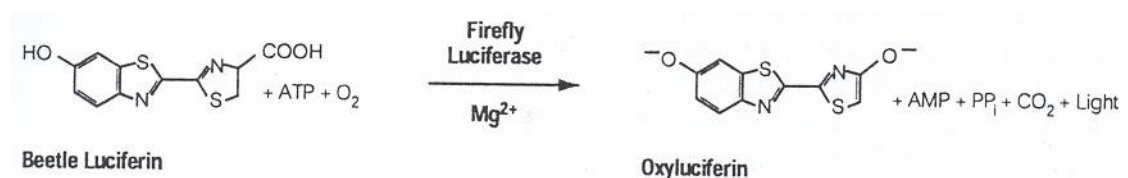


Figure II.26 : Schéma de la réaction catalysée par la luciférase. En présence d'ATP, d'O₂ et de Mg⁺², la luciférase oxyde la luciférine. Cette réaction produit, notamment, l'oxyluciférine et libère des photons. Cette émission de photons, qui peut être mesurée, est proportionnelle à la quantité d'enzyme (et à son activité) présente dans l'échantillon. (Promega, USA)

	Nom du plasmide	Provenance du plasmide	Nombre de boîtes présentes dans le promoteur	Méthode de révélation utilisée
p53	pG13PYLuc	Prof. B. Vogelstein (Howard Hughes Medical Institute, Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore)	13	1
AP-1	pRAP-1-luc	Karin & Hunter, 1995	7 (TRE)	2
CREB		Pei et al., 1991	4 (CRE)	2
NF-κB	pNF-κB-Luc	Pathdetect (Stratagene, USA)	5	1
HIF-1	p30A	Michel et al., 2002	6 (HRE)	2

Tableau II.14 : Différents plasmides utilisés.

Tampon phosphate stock 0,5 M pH 7,4		2 ml
MgCl ₂	Merck, Germany	20,3 mg
ONPG (o-nitrophenyl-β-D galacto-pyranoside)	Acros Organics, USA	66,5 mg
2-mercaptoéthanol	Fluka, Switzerland	350 µl

Tableau II.15 : Composition du substrat β-galactosidase pour 50 ml.

Facteur de transcription	Séquence	Article source
HIF-1	(G/C/T)-(A/G)-CGTG-(C/G/A)-(G/T/C)	Wenger et al., 1997
MEF-2	TATTTTTA	Han & Prywes, 1995
NFAT1	AGACCAAATTG	Loh et al., 1996

Tableau II.16 : Séquences consensus reconnues par les facteurs de transcription HIF-1, MEF-2 et NFAT1.

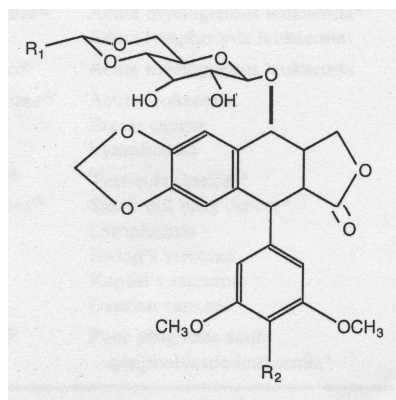


Figure III.1 : Structure chimique de l'étoposide. ($R_1 = -CH_3$ et $R_2 = -OH$) (Hande, 1998)

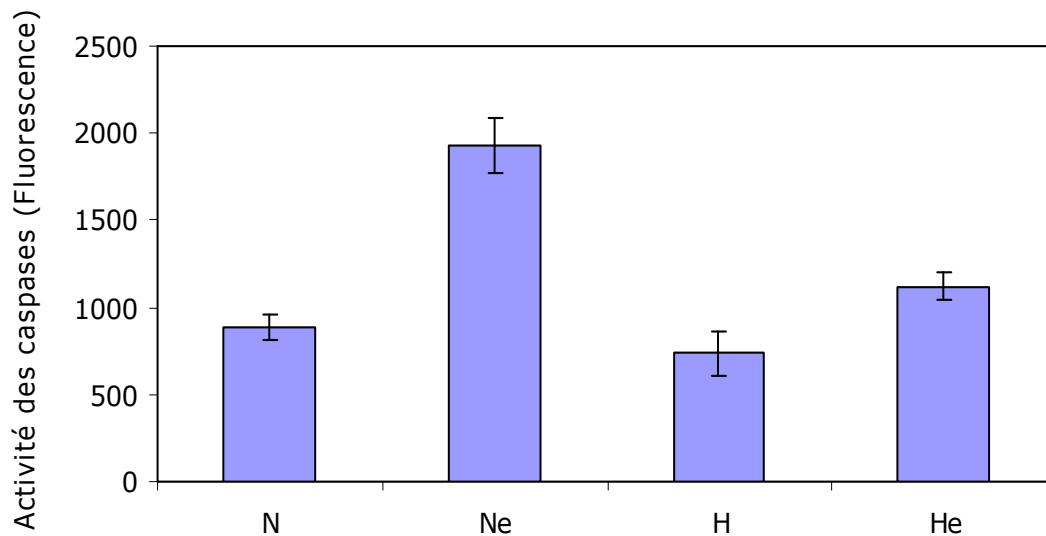


Figure III.2 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'activité des caspases. Les cellules HepG2 ont été incubées pendant 16 h dans du milieu CO₂ - indépendant en normoxie ou en hypoxie en présence (respectivement Ne et He) ou non (respectivement N et H) d'étoposide à une concentration de 50 μ M. Après l'incubation, l'activité des caspases est évaluée en étudiant la fluorescence de la rhodamine 110 libérée lors du clivage du DEVD-R110 par les caspases. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance en tant que moyennes \pm un écart-type (n = 3).

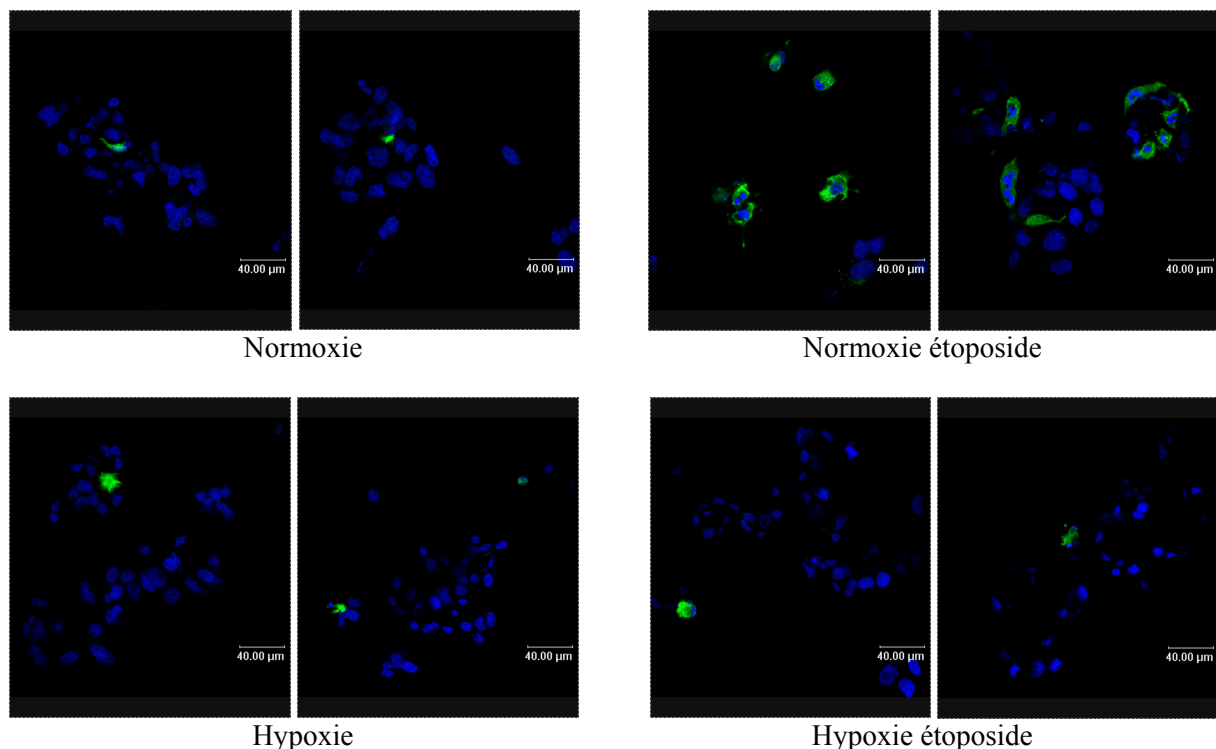


Figure III.3 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'abondance de la caspase 3 active. Les cellules HepG2 ont été incubées pendant 16 h dans du milieu CO₂ - indépendant en normoxie ou en hypoxie en présence ou non d'étoposide à une concentration de 50 μ M. Après l'incubation, l'abondance de la caspase 3 active a été évaluée par immunofluorescence.

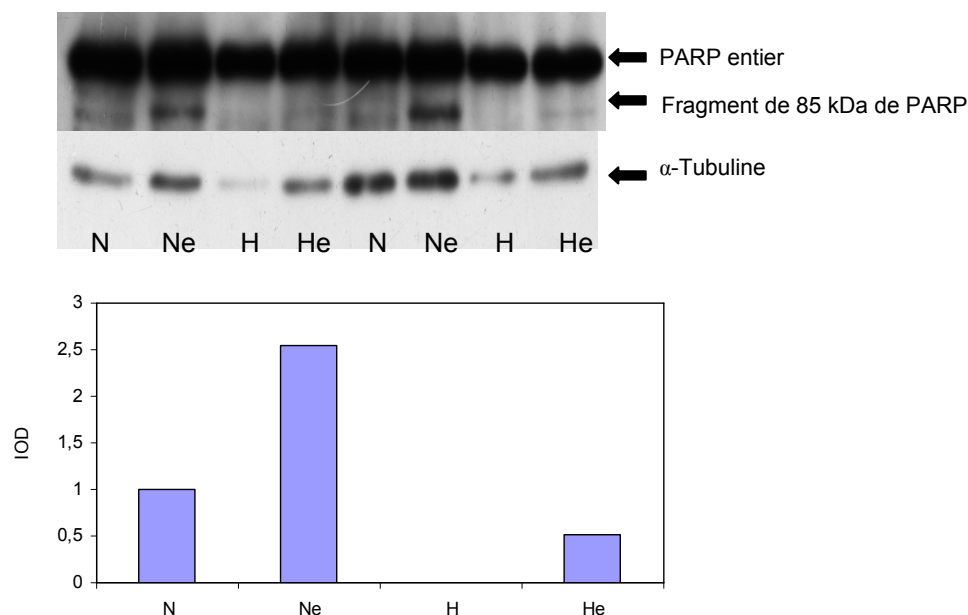


Figure III.4 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur le clivage de la protéine PARP. Les cellules HepG2 ont été incubées pendant 16 h dans du milieu CO₂ - indépendant dans quatre conditions : normoxie (N), normoxie étoposide 50 μM (Ne), hypoxie (H) et hypoxie étoposide 50 μM (He). Après l'incubation, la protéine PARP, clivée ou non, ainsi que l'α-tubuline, ont été mises en évidence par Western Blot. La densité optique des bandes correspondant au fragment de PARP est divisée par celle des bandes correspondant à l'α-tubuline. Les valeurs obtenues pour les doubles sont moyennées. Une représentation graphique de ces valeurs, normalisées pour obtenir 1 en normoxie, est présentée ici. (IOD, integrated optical density)

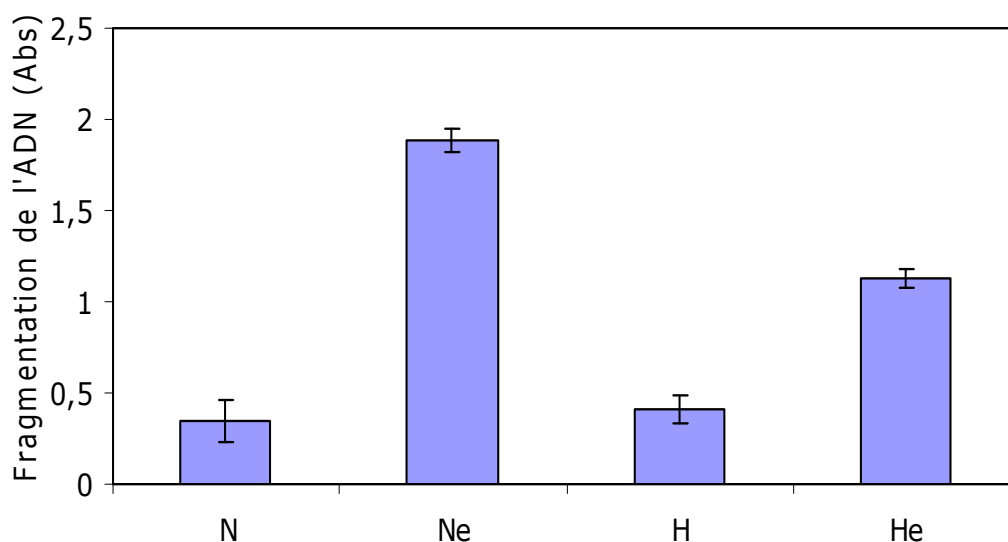


Figure III.5 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur la fragmentation de l'ADN. Les cellules HepG2 ont été incubées pendant 16 h dans du milieu CO₂ - indépendant dans quatre conditions : normoxie (N), normoxie étoposide 50 μM (Ne), hypoxie (H) et hypoxie étoposide 50 μM (He). Après l'incubation, la fragmentation de l'ADN est évaluée en utilisant un test de type ELISA pour les nucléosomes solubles. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance (Abs) en tant que moyennes ± un écart-type (n = 3).

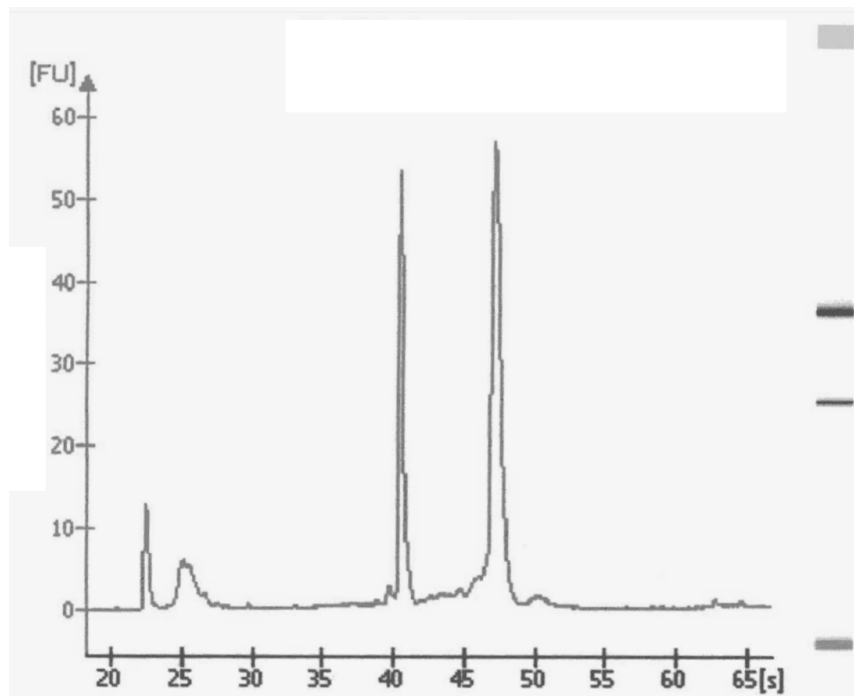


Figure III.6 : Exemple de profil obtenu lors de l'analyse d'un échantillon d'ARN total grâce au bioanalyser. La fluorescence associée aux différentes populations d'ARN est suivie en fonction du temps d'élution. Le premier pic correspond à l'élution du marqueur et les troisième et quatrième correspondent respectivement à l'ARNr 18S et 28S. En ce qui concerne le deuxième pic observé, il correspondrait aux ARN de transfert.

A

	N	Ne	H	He
BIRC3	1	2,99	1,53	2,31
CLK1	1	2,77	2,28	4,03
GADD45A	1	4,32	1,47	3,54
IGF2	1	2,67	1,59	1,57
IGFBP4	1	4,35	1,77	2,39
MCL1	1	3,44	3,92	5,27
ALDOA	1	1,00	1,43	1,59
BAG1	1	2,07	1,37	2,16
BIRC2	1	2,42	1,51	2,36
BIRC4	1	1,25	1,69	1,43
BNIP3	1	1,19	3,97	4,25
ING	1	1,48	1,83	1,97
JUN	1	1,66	2,33	3,28
MAP2K1	1	1,38	2,16	2,05
TANK	1	1,77	1,34	1,60
BAX	1	2,45	0,88	1,44
IGFBP2	1	1,83	1,21	1,30
MDM2	1	4,75	1,44	2,47
TNFRSF6	1	5,70	0,69	5,11
CASP1	1	2,84	1,00	1,71
GAPD	1	1,13	1,43	1,68
K-ALPHA-1	1	1,03	0,78	0,73
RPS9	1	1,30	1,19	1,48
CDK7	1	1,60	1,60	1,52
NFKB1	1	1,27	1,40	1,25
BCL2A1	1	2,01	0,85	1,27
CDKN1C	1	1,45	1,06	0,90
CDKN2B	1	1,64	0,98	0,81
MAPK12	1	1,96	1,10	1,06
RBL2	1	1,88	1,03	0,99
RBP1	1	2,05	1,01	1,16
RIPK1	1	1,58	0,87	1,00
TP53	1	1,82	0,68	0,85
TP73	1	1,62	1,06	0,94
YWHAZ	1	2,62	0,82	0,81

B

	N	Ne	H	He
BIRC5	1	1,07	0,68	0,66
CDC25C	1	2,17	0,60	0,59
CDK2	1	1,14	0,73	0,76
MAPK9	1	1,15	0,76	0,67
TFDP1	1	1,23	0,69	0,63
GSR	1	0,72	0,92	0,60
GSA	1	0,51	0,67	0,69
BID	1	1,50	0,83	1,06
BIK	1	2,09	0,63	0,92
CDK9	1	1,48	0,75	0,72
CLU	1	1,54	0,81	1,09
BclX	1	1,85	1,11	0,81
CASP2	1	1,12	0,83	0,81
CDK4	1	0,72	0,98	0,74
CDK5R1	1	1,43	0,87	0,75
CDK6	1	1,18	1,30	0,52
CSE1L	1	1,05	1,01	0,71
GRB2	1	1,31	0,83	0,72
IGF1R	1	1,26	1,10	0,66
LTB	1	1,38	0,97	0,82
PLK	1	1,14	0,81	0,46
TNFSF7	1	1,50	1,00	0,74
TRAF3	1	1,40	0,89	0,76

C

	N	Ne	H	He
BAK 1	1	3,42	0,75	2,13
CDKN1A	1	3,02	0,52	1,64
GPX1	1	2,88	0,69	1,43
CDC2	1	3,22	0,74	0,83
PCNA	1	2,23	0,62	1,68
AKT2	1	1,55	1,00	0,78
E2F5	1	1,20	1,90	0,61

Valeur supérieure à 1 + un écart-type

Valeur inférieure à 1 - un écart-type

Tableau III.1 : Présentation des degrés d'induction par rapport à la normoxie de 65 gènes, sélectionnés parmi les 123 gènes détectables à l'aide de la « DualChip™ human apoptosis », pour lesquels une variation significative d'expression a été détectée dans au moins une des trois conditions étudiées. Une valeur supérieure à 1 indique une induction tandis qu'une valeur inférieure à 1 indique une diminution d'expression. Ces résultats ont été obtenus à partir de 3 cultures indépendantes pour lesquelles une extraction d'ARN a été réalisée indépendamment. Pour chaque échantillon d'ARN, trois rétrotranscriptions ont été effectuées, et les produits de celles-ci ont été hybridés sur damiers. (N, normoxie ; Ne, normoxie étoposide 50 µM ; H, hypoxie ; He, hypoxie étoposide 50 µM)

		<u>N</u>	<u>Ne</u>	<u>H</u>	<u>He</u>
<u>MCL1</u>	real time	1	2,97	5,53	8,24
	chip (doubles)	1	4,26	2,96	4,18
	chip (triples)	1	3,44	3,92	5,27
<u>BAK 1</u>	real time	1	3,37	0,96	2,92
	chip (doubles)	1	4,57	0,54	1,39
	chip (triples)	1	3,42	0,75	2,13
<u>GPX1</u>	real time	1	4,04	0,94	2,21
	chip (doubles)	1	3,37	0,61	1,31
	chip (triples)	1	2,88	0,69	1,43
<u>CDKN1A</u>	real time	1	3,65	0,72	2,44
	chip (doubles)	1	3,83	0,41	1,22
	chip (triples)	1	3,02	0,52	1,64
<u>JUN</u>	real time	1	1,45	5,54	4,36
	chip (doubles)	1	2,19	1,38	1,71
	chip (triples)	1	1,66	2,33	3,28

Tableau III.2 : Comparaison des résultats, exprimés en niveau d'induction, obtenus par Real-Time PCR et grâce à la « DualChipTM human apoptosis » sur deux échantillons (ou trois pour la chip). (N, normoxie ; Ne, normoxie étoposide 50 μ M ; H, hypoxie ; He, hypoxie étoposide 50 μ M)

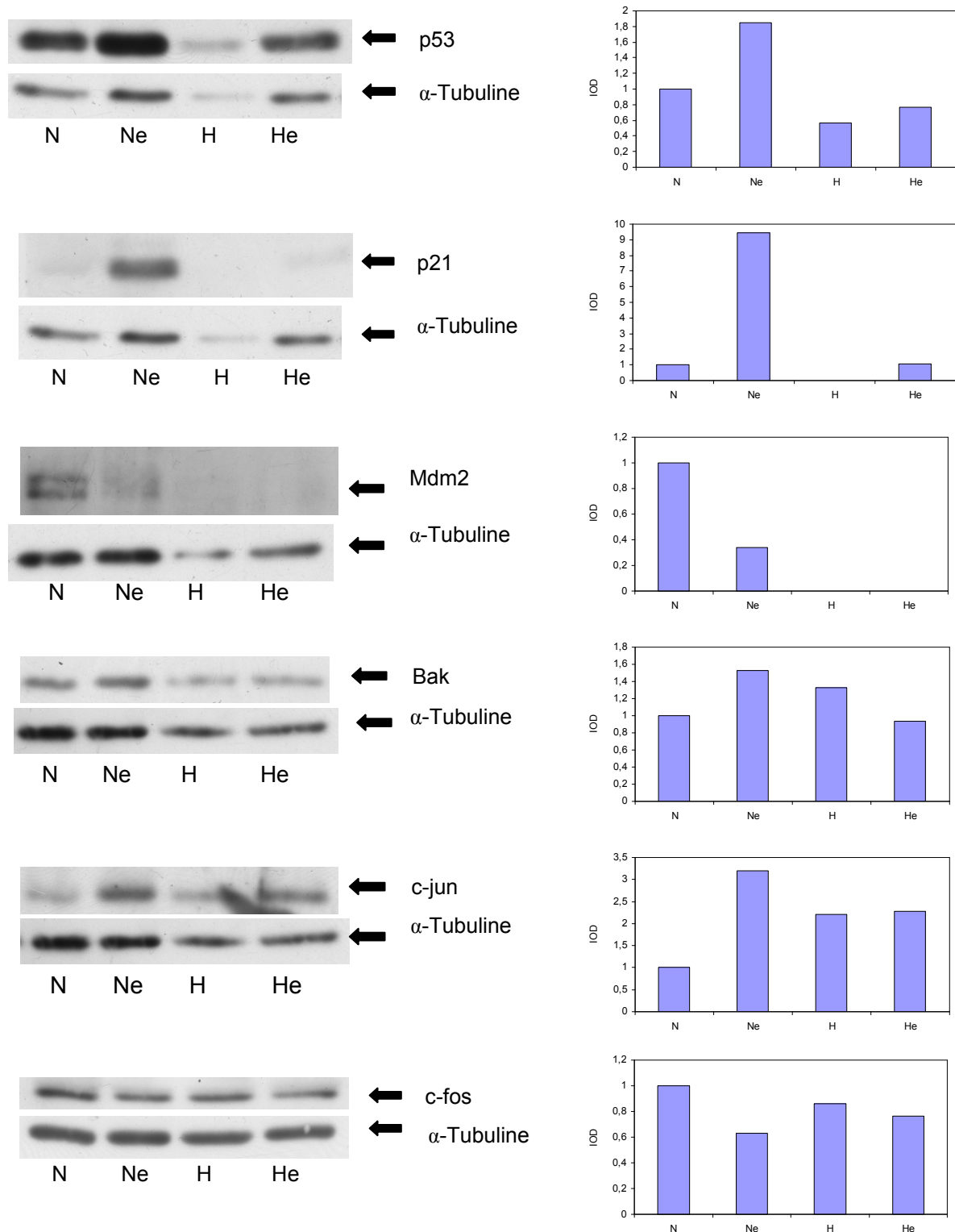


Figure III.7 : Effet de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'expression de 6 protéines d'intérêt. Après une incubation de 16 h dans différentes conditions (normoxie (N), normoxie étoposide 50 μ M (Ne), hypoxie (H), hypoxie étoposide 50 μ M (He)), l'abondance relative de p53, p21, Mdm2, Bak, c-jun et c-fos, ainsi que de l' α -tubuline pour la normalisation, a été estimée par Western Blot. La densité optique des bandes obtenues pour chaque protéine, dans chaque condition, est divisée par celle des bandes correspondant à l' α -tubuline. Une représentation graphique de ces valeurs, normalisées pour obtenir 1 en normoxie, est présentée à droite des Western Blots correspondants. (IOD, integrated optical density)

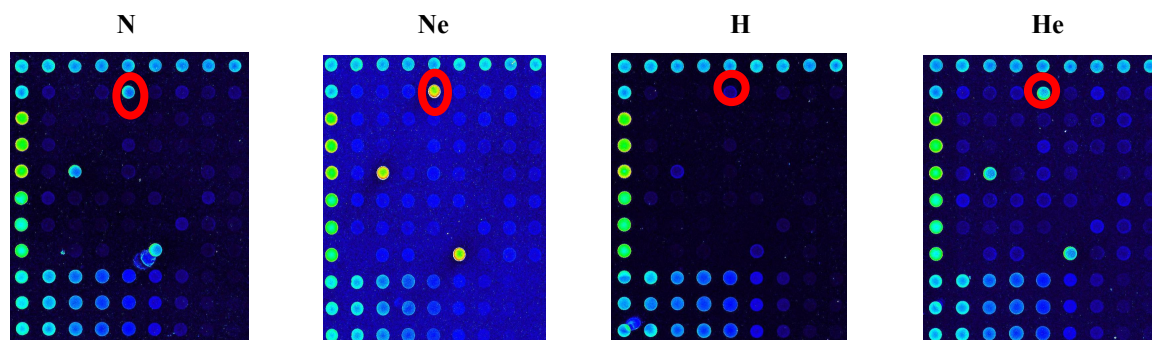


Figure III.8 : Images obtenues après avoir scanné, au gain 60, 4 damiers de la TFChipMAPK obtenus avec des échantillons provenant de chaque condition expérimentale étudiée: normoxie (N), normoxie étoposide 50 μ M (Ne), hypoxie (H) et hypoxie étoposide 50 μ M (He). Un spot représentant la liaison à l'ADN de p53 est entouré en rouge sur chacune. On peut comparer la couleur de ce spot avec la courbe de concentration présente sur les côtés gauche et inférieur de chaque damier, du plus concentré au moins concentré.

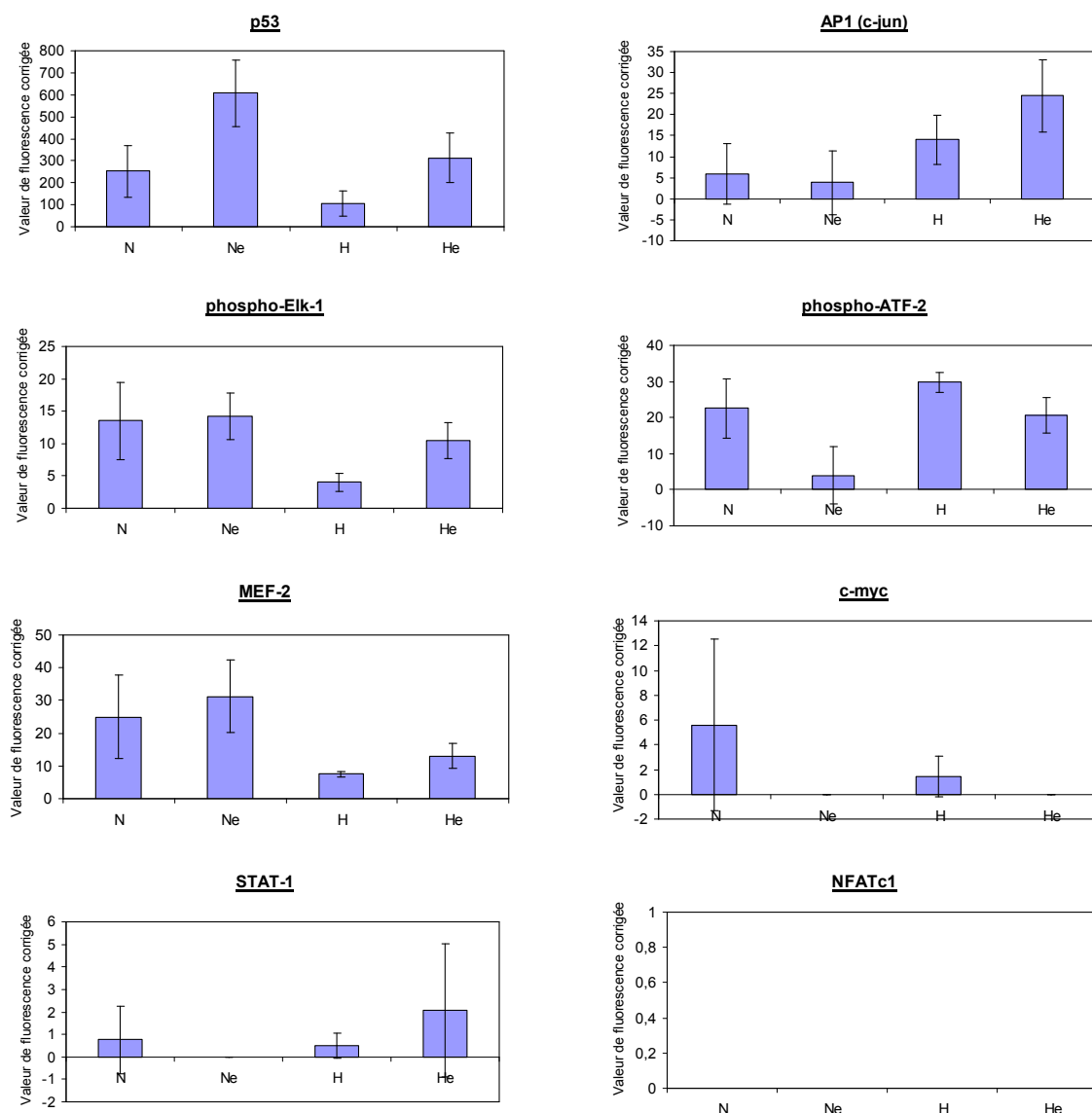


Figure III.9 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'activité de liaison à l'ADN de 8 facteurs de transcription. Les cellules ont été incubées 16 h dans les 4 conditions étudiées (normoxie (N), normoxie étoposide 50 μ M (Ne), hypoxie (H) et hypoxie étoposide 50 μ M (He)). Après l'incubation, les protéines nucléaires sont extraites et hybridées sur la TFChipMAPK. Les résultats, exprimés en valeurs de fluorescence corrigées, sont présentés sous forme de moyennes \pm un écart-type ($n = 3$ ou 4 expériences indépendantes).

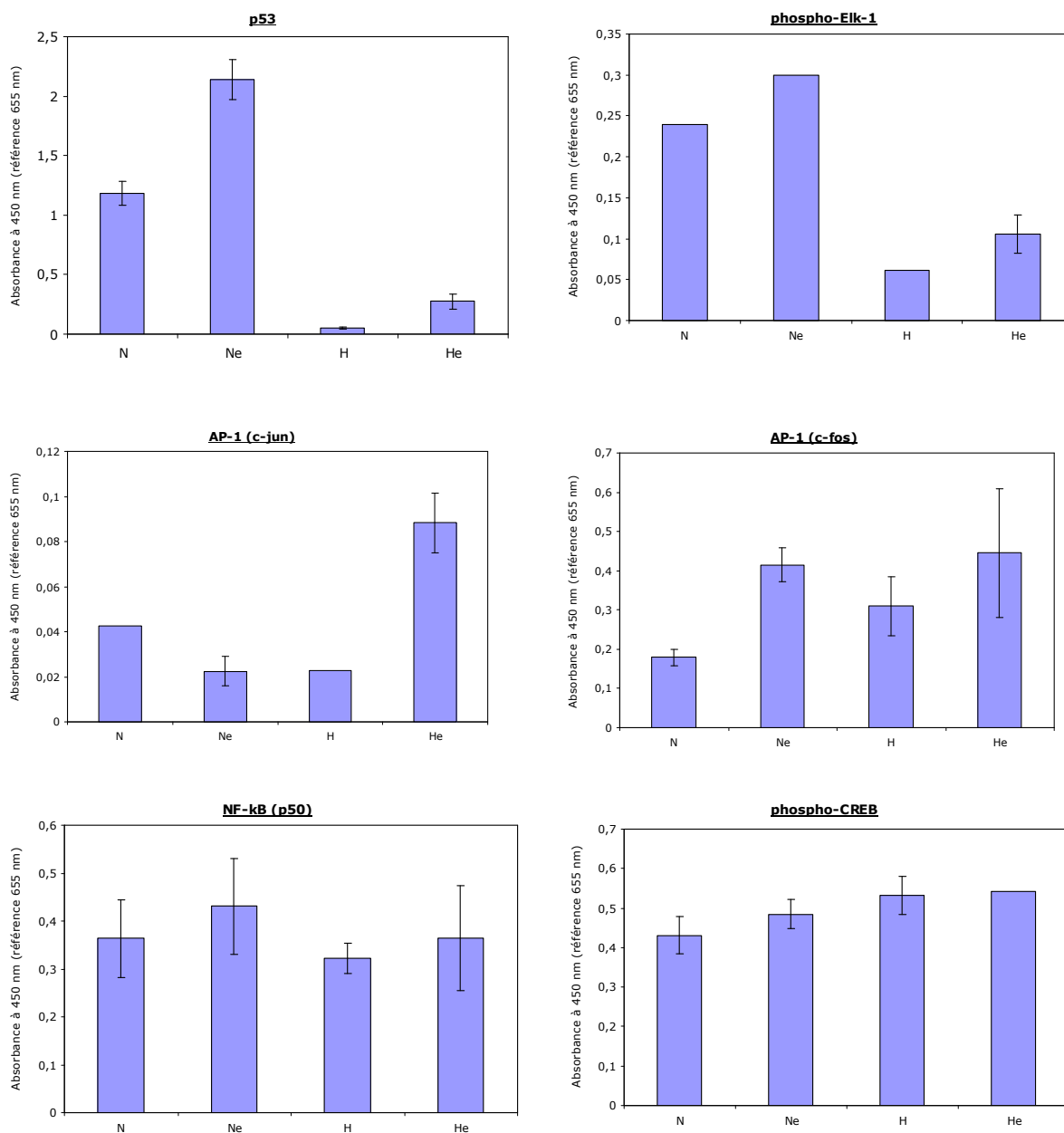


Figure III.10 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'activité de liaison à l'ADN de 6 facteurs de transcription. Les cellules ont été incubées 16 h dans les 4 conditions étudiées (normoxie (N), normoxie étoposide 50 µM (Ne), hypoxie (H) et hypoxie étoposide 50 µM (He)). Après l'incubation, les protéines nucléaires sont extraites et la liaison à l'ADN de facteurs de transcription est estimée par Trans-AM. Les valeurs d'absorbance à 450 nm (référence 655 nm) sont présentées ici sous forme de moyennes \pm un écart-type (n = 3 expériences indépendantes).

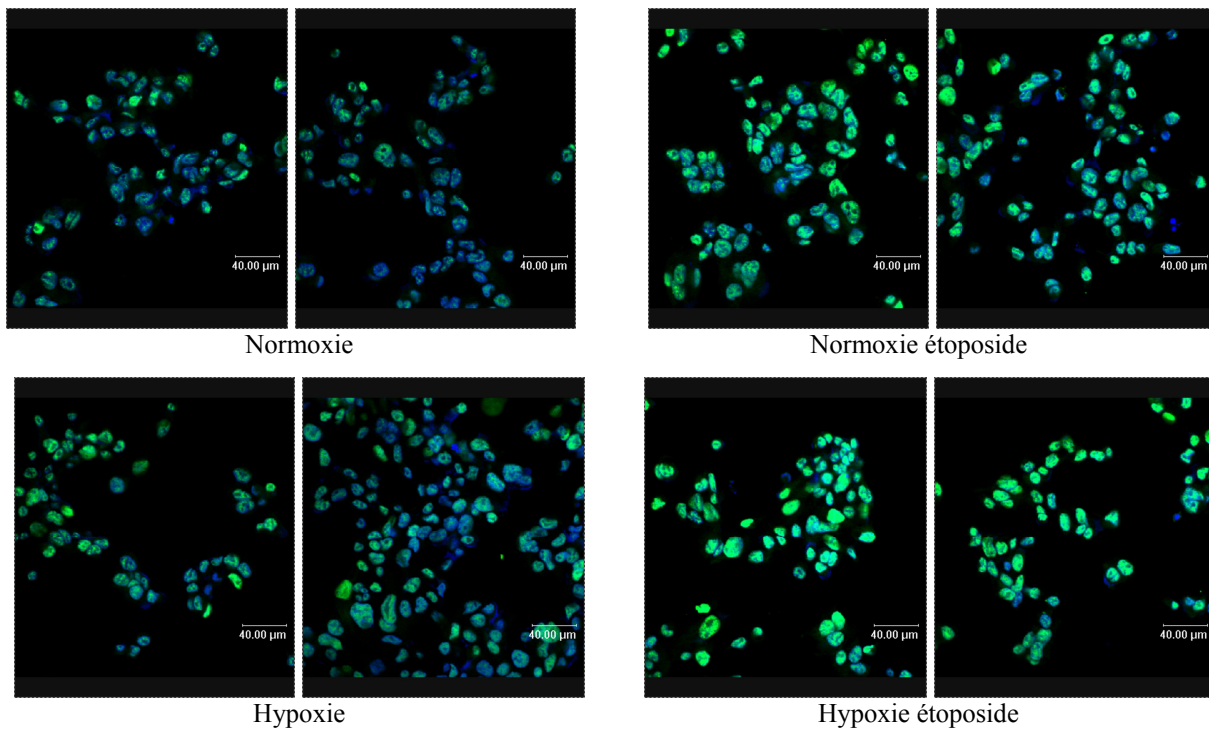


Figure III.11 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'abondance et la localisation subcellulaire de c-jun. Après une incubation de 16 h en normoxie, normoxie étoposide 50 μ M, hypoxie, et hypoxie étoposide 50 μ M, la protéine c-jun est détectée par immunofluorescence (en vert) et les noyaux sont marqués au To-Pro3 (en bleu). Les cellules sont alors observées en microscopie confocale.

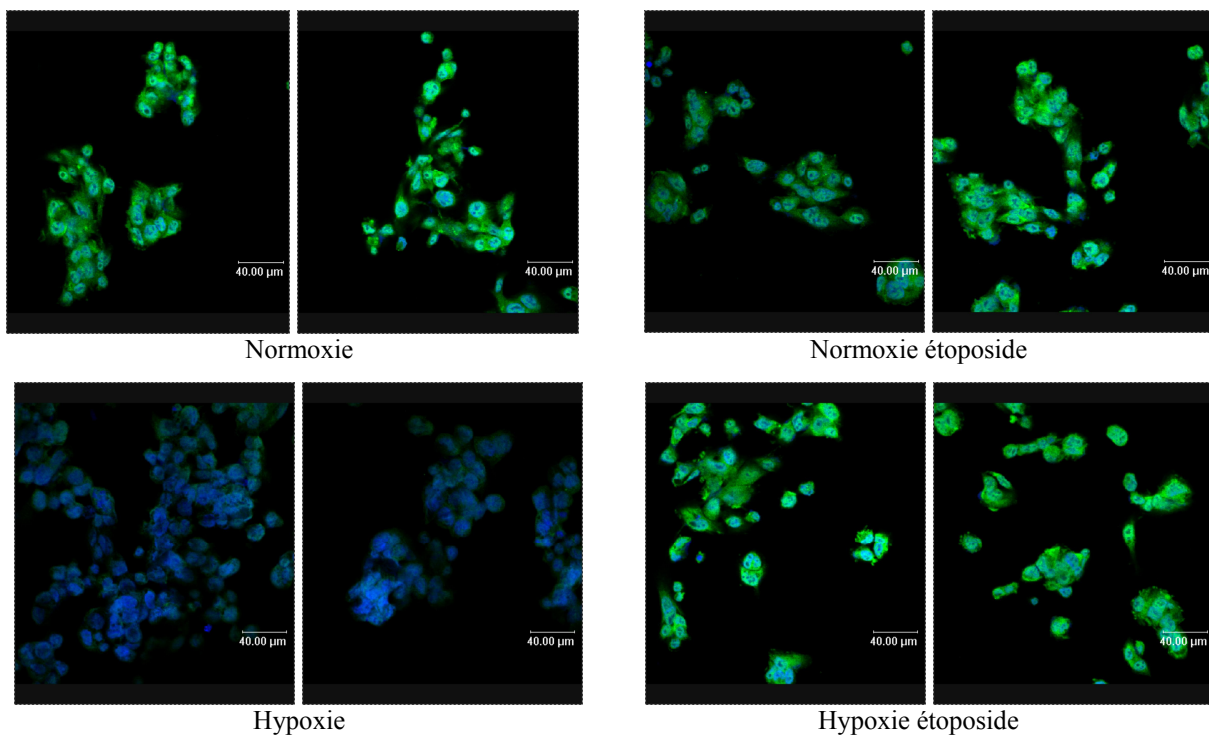


Figure III.12 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'abondance et la localisation subcellulaire de c-fos. Après une incubation de 16 h en normoxie, normoxie étoposide 50 μ M, hypoxie, et hypoxie étoposide 50 μ M, la protéine c-fos est détectée par immunofluorescence (en vert) et les noyaux sont marqués au To-Pro3 (en bleu). Les cellules sont alors observées en microscopie confocale.

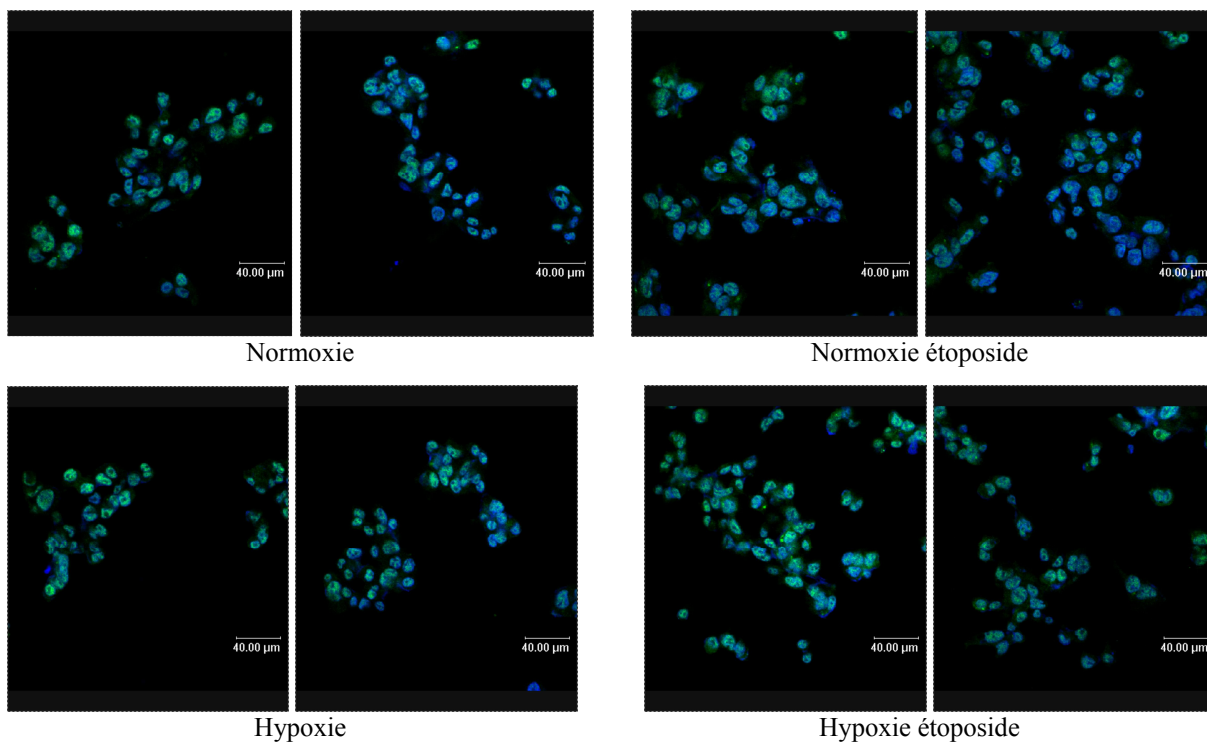


Figure III.13 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'abondance et la localisation subcellulaire de phospho-Elk-1. Après une incubation de 16 h en normoxie, normoxie étoposide 50 μ M, hypoxie et hypoxie étoposide 50 μ M, la protéine phospho-Elk-1 est détectée par immunofluorescence (en vert) et les noyaux sont marqués au To-Pro3 (en bleu). Les cellules sont alors observées en microscopie confocale.

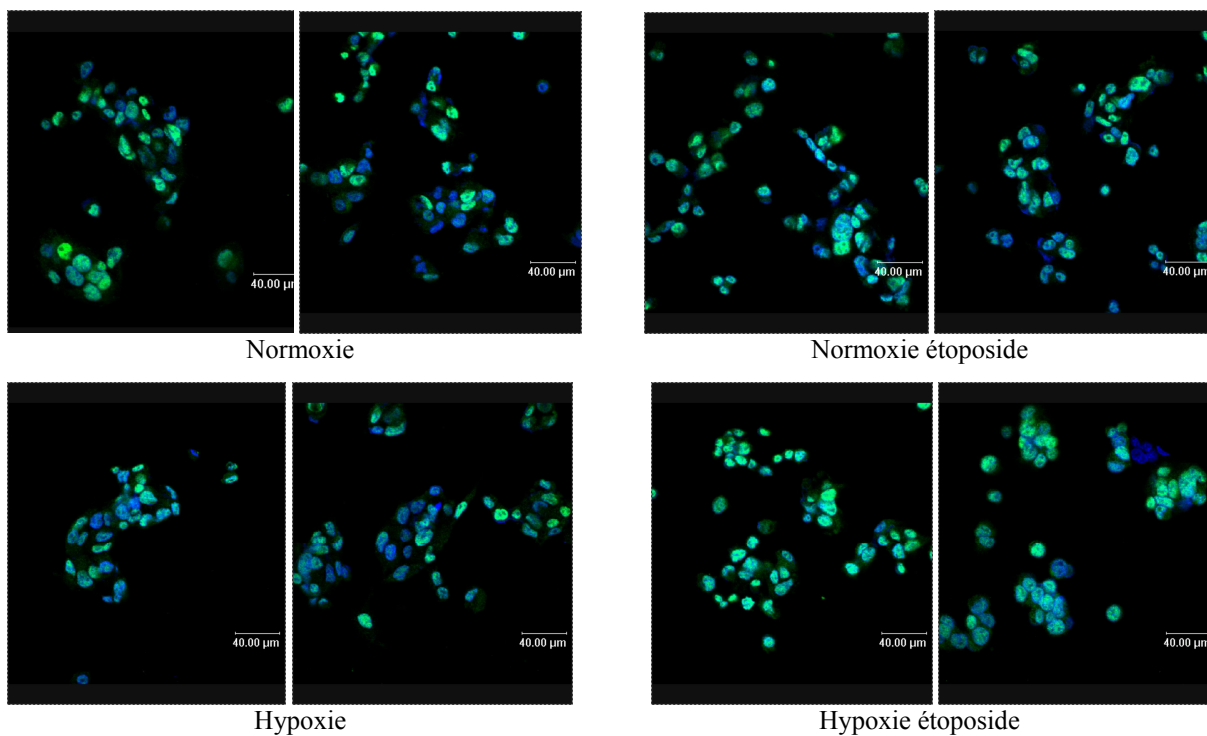


Figure III.14 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'abondance et la localisation subcellulaire de phospho-ATF-2. Après une incubation de 16 h en normoxie, normoxie étoposide 50 μ M, hypoxie et hypoxie étoposide 50 μ M, la protéine phospho-ATF-2 est détectée par immunofluorescence (en vert) et les noyaux sont marqués au To-Pro3 (en bleu). Les cellules sont alors observées en microscopie confocale.

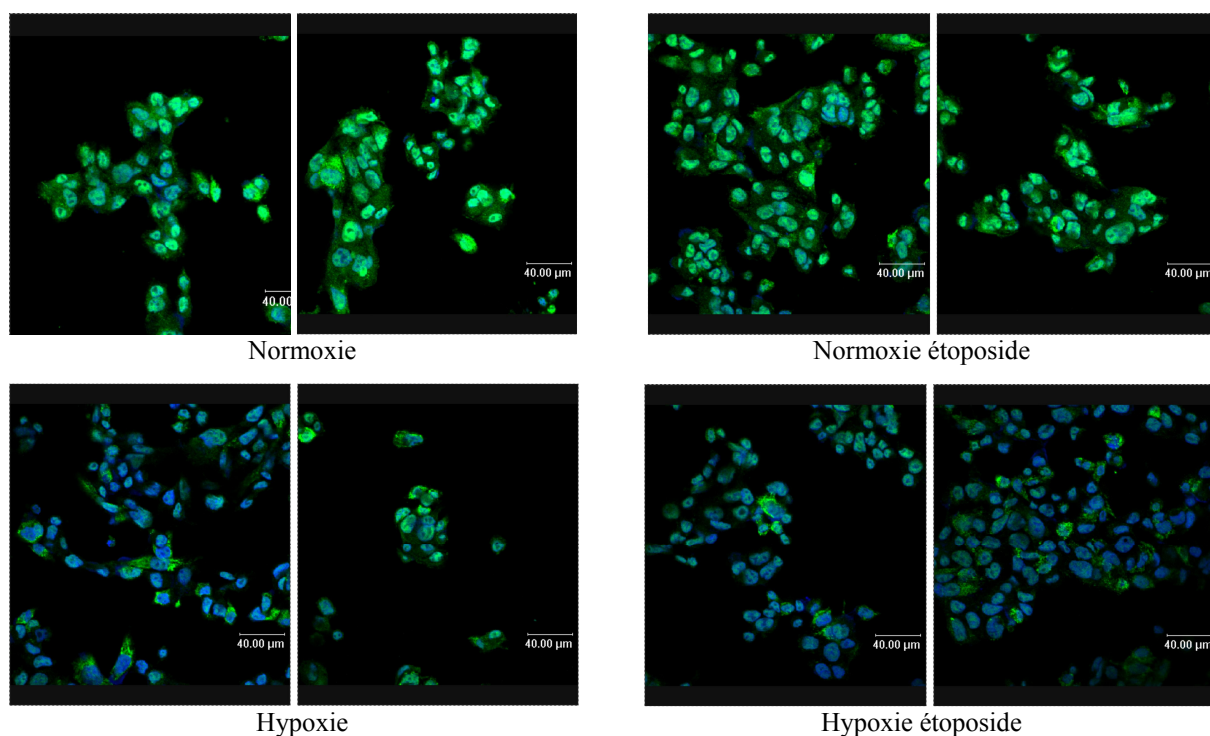


Figure III.15 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'abondance et la localisation subcellulaire de phospho-CREB. Après une incubation de 16 h en normoxie, normoxie étoposide 50 μ M, hypoxie et hypoxie étoposide 50 μ M, la protéine phospho-CREB est détectée par immunofluorescence (en vert) et les noyaux sont marqués au To-Pro3 (en bleu). Les cellules sont alors observées en microscopie confocale.

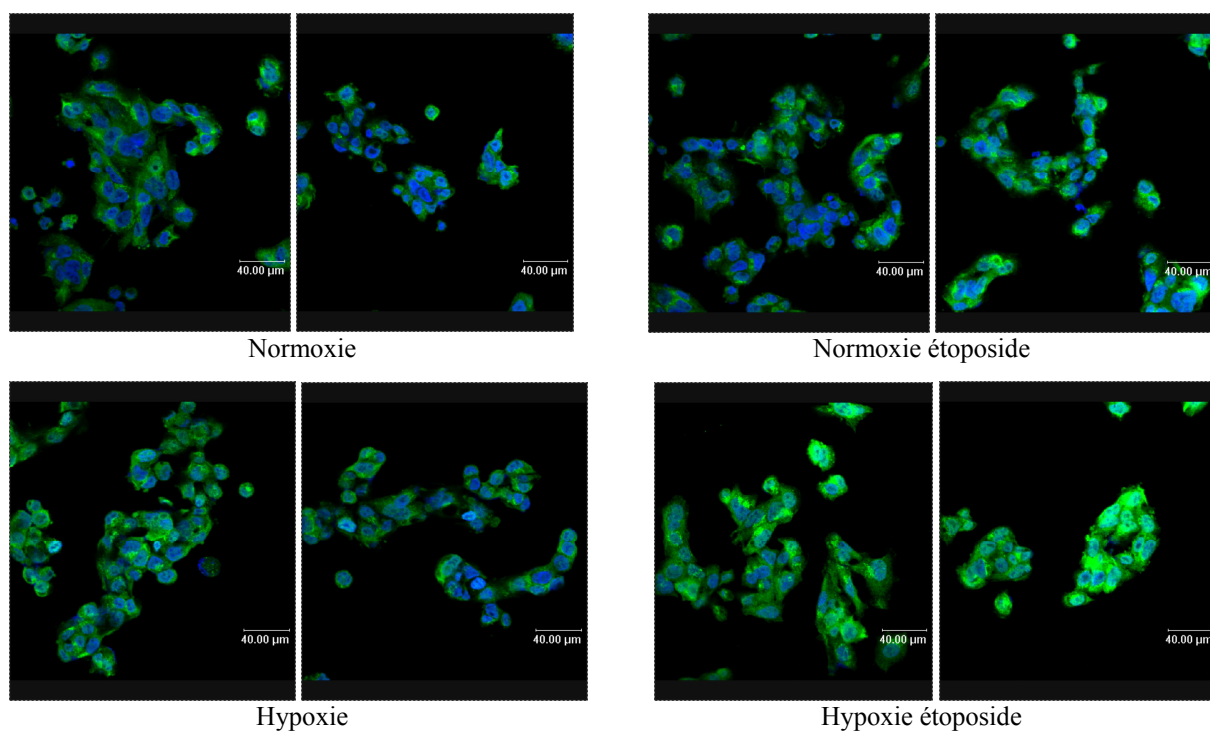


Figure III.16 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'abondance et la localisation subcellulaire de STAT-1 α . Après une incubation de 16 h en normoxie, normoxie étoposide 50 μ M, hypoxie et hypoxie étoposide 50 μ M, la protéine STAT-1 α est détectée par immunofluorescence (en vert) et les noyaux sont marqués au To-Pro3 (en bleu). Les cellules sont alors observées en microscopie confocale.

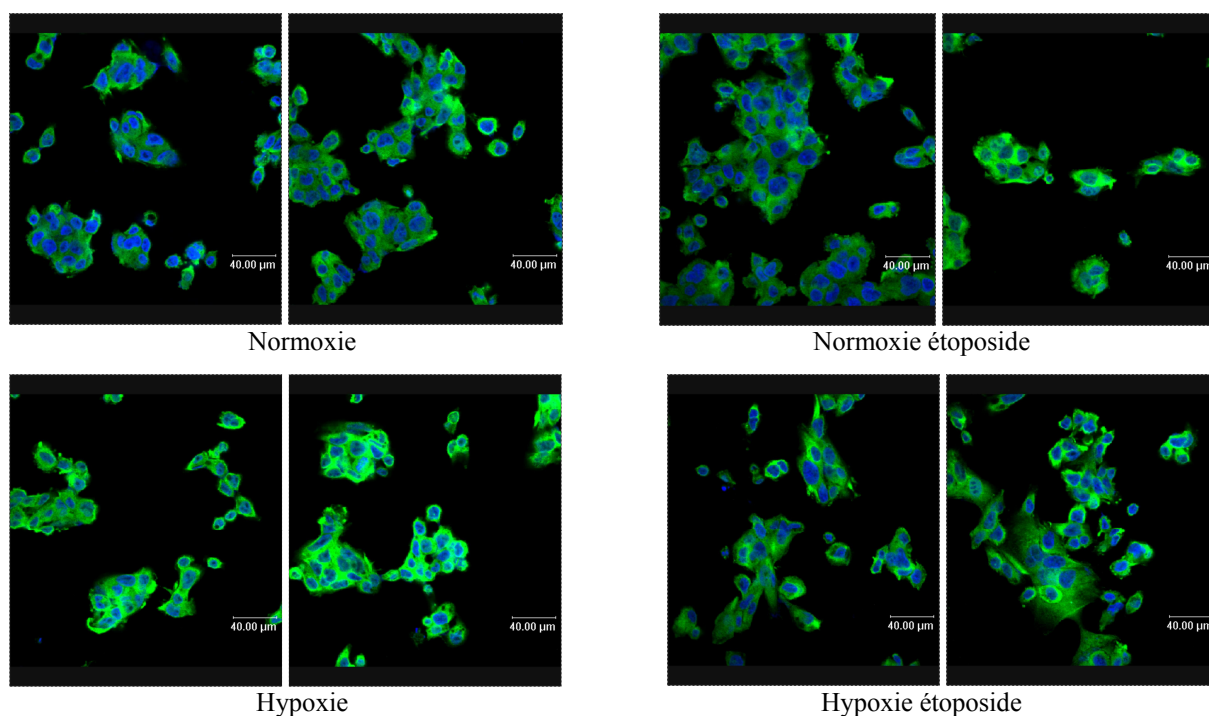


Figure III.17 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'abondance et la localisation subcellulaire de la protéine p53 du facteur de transcription NF- κ B. Après une incubation de 16 h en normoxie, normoxie étoposide 50 μ M, hypoxie et hypoxie étoposide 50 μ M, la protéine p53 du facteur de transcription NF- κ B est détectée par immunofluorescence (en vert) et les noyaux sont marqués au To-Pro3 (en bleu). Les cellules sont alors observées en microscopie confocale.

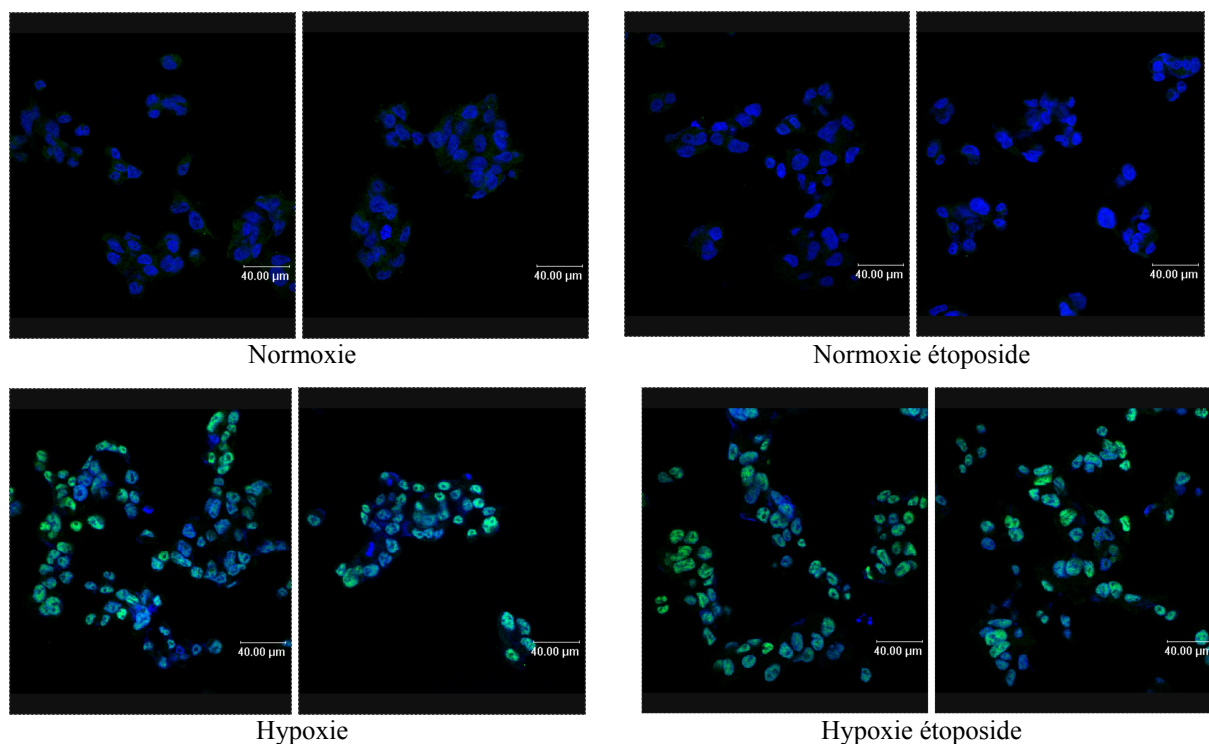


Figure III.18 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'abondance et la localisation subcellulaire de HIF-1 α . Après une incubation de 16 h en normoxie, normoxie étoposide 50 μ M, hypoxie et hypoxie étoposide 50 μ M, la protéine HIF-1 α est détectée par immunofluorescence (en vert) et les noyaux sont marqués au To-Pro3 (en bleu). Les cellules sont alors observées en microscopie confocale.

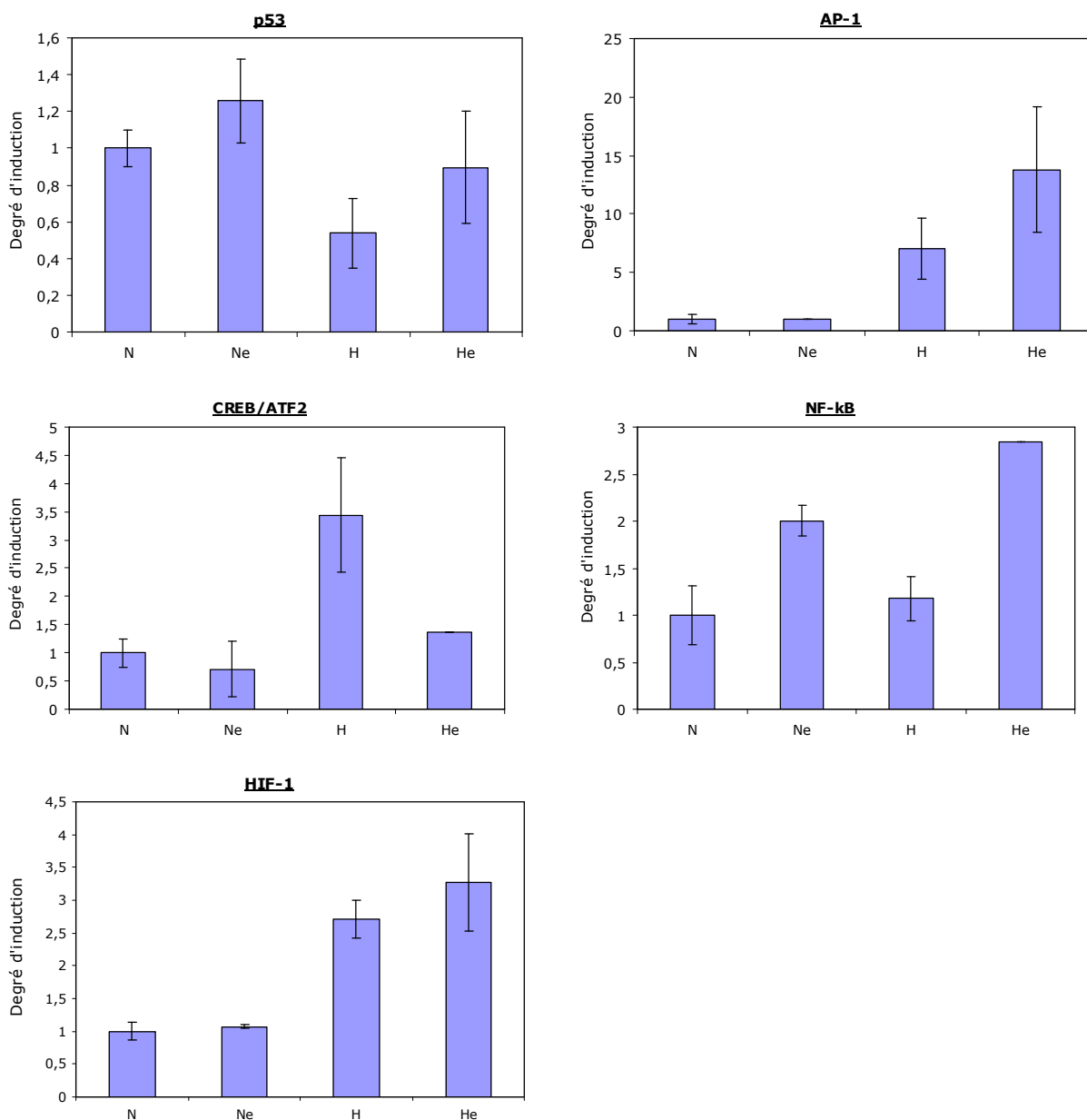


Figure III.19 : Effets de l'hypoxie et de l'étoposide sur l'activité transcriptionnelle de 5 facteurs de transcription. Après avoir été transfectées avec les plasmide rapporteurs, les cellules ont été incubées 16 h dans les 4 conditions étudiées (normoxie (N), normoxie étoposide 50 µM (Ne), hypoxie (H) et hypoxie étoposide 50 µM (He)). Les activités luciférase et β-galactosidase sont mesurées et un rapport de leur activité, normalisé pour obtenir 1 en normoxie, est effectué. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± un écart-type (n = 3).

			N	Ne	H	He	
p53			TFChipMAPK	++	+++	+	++
			Trans-AM	++	+++	0	+
			Abondance nucléaire (IF)	/	/	/	/
			Système rapporteur	++	+++	+	++
AP-1	c-jun	TFChipMAPK	+	+	++	+++	
		Trans-AM	++	+	+	+++	
		Abondance nucléaire (IF)	+	+++	++	+++	
	c-fos	TFChipMAPK	/	/	/	/	
		Trans-AM	+	+++	++	+++	
		Abondance nucléaire (IF)	+++	+++	+	+++	
		Système rapporteur	+	+	++	+++	
Phospho-Elk-1			TFChipMAPK	++	++	+	++
			Trans-AM	++	+++	+	+
			Abondance nucléaire (IF)	+	+	+	+
			Système rapporteur	/	/	/	/
Phospho-ATF-2			TFChipMAPK	++	+	++	++
			Trans-AM	/	/	/	/
			Abondance nucléaire (IF)	+	+	+	++
Phospho-CREB			TFChipMAPK	/	/	/	/
			Trans-AM	+	+	+	+
			Abondance nucléaire (IF)	++	++	+	+
CREB/ATF-2			Système rapporteur	+	+	+++	+
MEF-2			TFChipMAPK	++	++	+	+
			Trans-AM	/	/	/	/
			Abondance nucléaire (IF)	/	/	/	/
			Système rapporteur	/	/	/	/
c-myc			TFChipMAPK	++	0	+	0
			Trans-AM	/	/	/	/
			Abondance nucléaire (IF)	/	/	/	/
			Système rapporteur	/	/	/	/
STAT-1			TFChipMAPK	+	0	+	++
			Trans-AM	/	/	/	/
			Abondance nucléaire (IF)	+	+	++	+++
			Système rapporteur	/	/	/	/
NFATc1			TFChipMAPK	0	0	0	0
			Trans-AM	/	/	/	/
			Abondance nucléaire (IF)	/	/	/	/
			Système rapporteur	/	/	/	/
NF-κB	p50	TFChipMAPK	/	/	/	/	
		Trans-AM	+	+	+	+	
		Abondance nucléaire (IF)	/	/	/	/	
	p65	TFChipMAPK	/	/	/	/	
		Trans-AM	/	/	/	/	
		Abondance nucléaire (IF)	+	+	++	+	
		Système rapporteur	+	++	+	+++	
HIF-1	HIF-1α	TFChipMAPK	/	/	/	/	
		Trans-AM	/	/	/	/	
		Abondance nucléaire (IF)	0	0	++	++	
			Système rapporteur	+	+	++	++

Tableau III.3 : Tableau récapitulatif des résultats des études destinées à suivre l'activation des facteurs de transcription. (N, normoxie ; Ne, normoxie étoposide ; H, hypoxie ; He, hypoxie étoposide ; IF, immunofluorescence ; 0, non détecté ; /, expérience non réalisée)

	L prom.	N	Ne	H	He	AP-1	Elk-1	CREB/ATF-2	c-myc/max	STATx	NF-κB	MEF-2	HIF-1	p53
CLK1	640	1	2,77	2,28	4,03	1	0	0	0	0	0	0	0	
GADD45A	885	1	4,32	1,47	3,54	0	0	0	0	0	1	0	2	1
IGF2	2978	1	2,67	1,59	1,57	0	1	1	0	0	3	0	8	
IGFBP4	714	1	4,35	1,77	2,39	0	0	0	0	0	1	0	0	4
MCL1	3893	1	3,44	3,92	5,27	3	2	1	2	1	1	4	6	2
BNIP3	1999	1	1,19	3,97	4,25	0	0	0	1	2	2	0	8	2
JUN	1916	1	1,66	2,33	3,28	0	2	3	0	1	2	1	2	
BAX	600	1	2,45	0,88	1,44	1	0	0	0	0	1	0	1	1
MDM2	1970	1	4,75	1,44	2,47	2	0	1	0	0	0	2	1	1
CDKN2B	1217	1	1,64	0,98	0,81	2	0	0	1	1	0	2	0	2
TP53	1976	1	1,82	0,68	0,85	0	0	0	0	1	3	0	1	
CDC25C	1988	1	2,17	0,60	0,59	1	0	2	0	1	0	1	4	
BIK	1906	1	2,09	0,63	0,92	2	0	0	1	0	4	1	3	4
BclX	719	1	1,85	1,11	0,81	0	2	0	0	0	3	0	1	
BAK 1	4000	1	3,42	0,75	2,13	7	1	3	0	2	1	4	7	2
CDKN1A	1339	1	3,02	0,52	1,64	1	0	0	0	2	1	0	1	2
GPX1	1842	1	2,88	0,69	1,43	3	1	0	0	1	0	0	1	X
CDC2	1308	1	3,22	0,74	0,83	0	0	0	0	0	0	0	3	

Tableau III.4 : Tableau reprenant 18 gènes de la DualChip dont les valeurs d'induction en normoxie étoposide et en hypoxie étoposide sont les plus différentes. La deuxième colonne (L prom.) indique le nombre de paires de bases de promoteur sélectionnées en amont de la région codant pour l'ARNm. Les quatre colonnes suivantes représentent les niveaux d'induction par rapport à la normoxie (N) pour chaque condition (normoxie étoposide (Ne), hypoxie (H), hypoxie étoposide (He)) (cfr Tableau III.1). Les cases surlignées en bleu correspondent aux valeurs supérieures à 1 plus un écart-type et celles surlignées en jaune à celles qui sont inférieures à 1 moins un écart-type. Dans les colonnes suivantes, sont exprimés les nombres de sites consensus pour les différents facteurs de transcription trouvés par le programme TFSEARCH. En ce qui concerne MEF-2 et HIF-1, les sites consensus ont été recherchés manuellement. Pour les sites p53, une liste de gènes présente sur le site <http://linkage.rockefeller.edu/p53/a> été utilisée en prenant en compte 5000 paires de bases en amont de la région codant pour l'ARNm. Dans certains cas, une croix a été placée car il est connu que ce gène est un gène cible de p53 mais il n'a pas été trouvé sur le site mentionné ci-dessus.

